

# CONTRIBUTION A L'ETUDE DU GLYCOGÈNE INTRA-LEUCOCYTAIRE SON IMPORTANCE AU COURS DE LA PHAGOCYTOSE

---

## THÈSE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR EN PHARMACIE  
(DIPLOME D'UNIVERSITÉ)

Présentée et soutenue le 18 Janvier 1954

par

**CLAUDE AVICE**

*Pharmacien*

*Diplômé des Certificats d'Etudes Supérieures  
de Bactériologie, Sérologie, Hématologie, Parasitologie*

---

Mademoiselle S. LAMBIN, Président  
Monsieur G. VALETTE, Professeur  
Monsieur A. GERMAN, Maître de Conférences





# Personnel de la Faculté de Pharmacie de Paris

## ADMINISTRATION

MM. RENÉ FABRE, *Doyen*, C. ✱, ✱ I.  
DELABY, *Assesseur*, O. ✱, ✱ I.  
G. CUVIER, *Secrétaire Général*, ✱ I.

MM.

L. JEANDEL, *Secrétaire*, ✱ I. E. BUVAT, *Commis*, ✱ I.  
A. QUILLIOT, *Rédacteur*. M<sup>lle</sup> M. DENNY, *Commis*.  
M<sup>me</sup> M.-L. ESPINASSE, *Rédactrice*, ✱ A.

## PROFESSEURS

|                                       |                                                                   |
|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| MM. FABRE, C. ✱, ✱ I. ....            | Toxicologie.                                                      |
| DELABY, O. ✱, ✱ I. ....               | Pharmacie chimique.                                               |
| FLEURY, ✱, ✱ I. ....                  | Chimie biologique.                                                |
| PICON, O. ✱, ✱ I. ....                | Chimie minérale.                                                  |
| MASCRE, ✱, ✱ I. ....                  | Botanique.                                                        |
| JANOT, ✱, ✱ I. ....                   | Pharmacie galénique.                                              |
| CHARONNAT, ✱, ✱ I. ...                | Chimie organique.                                                 |
| VALETTE, ✱, ✱ I. ....                 | Pharmacodynamie.                                                  |
| BEDDEL, ✱, ✱ I. ....                  | Législation, Déontologie et Histoire<br>de la Pharmacie.          |
| PARIS, ✱ A. ....                      | Histoire naturelle des médicaments<br>simples d'origine végétale. |
| GUILLOT, ✱, ✱ I. ....                 | Physique.                                                         |
| GAUTIER, ✱ I. ....                    | Chimie analytique.                                                |
| LAMBIN (M <sup>lle</sup> ), ✱ I. .... | Microbiologie.                                                    |
| RAOUL, ✱ A. ....                      | Zoologie appliquée.                                               |
| DOMANGE, ✱, ✱ I. ....                 | } Professeurs sans chaire.                                        |
| CRETE, ✱ A. ....                      |                                                                   |
| COURTOIS, ✱, ✱ A. ....                |                                                                   |

*Doyen honoraire* : M. RADAIS, C. ✱, ✱ I.

## PROFESSEURS HONORAIRES

MM. DÉLÉPINE, C. ✱, ✱ I. et LEBEAU, C. ✱, ✱ I., Membres de  
l'Institut.  
BOUGAULT, C. ✱, ✱ I., HERISSEY, C. ✱, ✱ I.  
LAUNOY, O. ✱, ✱ I.

## MAITRES DE CONFERENCES

|                           |                                  |
|---------------------------|----------------------------------|
| MM. MORETTE, ✱, ✱ A. .... | Sciences physiques et chimiques. |
| CAVIER, ✱ I. ....         | Sciences naturelles.             |
| TRUHAUT, ✱, ✱ I. ....     | Sciences physiques et chimiques. |
| MOREAU, ✱ A. ....         | Sciences physiques et chimiques. |
| GUY .....                 | Sciences physiques et chimiques. |
| GERMAN, ✱ A. ....         | Sciences naturelles.             |
| N .....                   | Sciences naturelles.             |

## CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

|                        |                                         |
|------------------------|-----------------------------------------|
| MM. CORRIEZ, ✱ I. .... | Physique.                               |
| HARISPE, ✱ A. ....     | Travaux pratiques, première année.      |
|                        | Chimie générale et pharmaceutique.      |
| DEYSSON .....          | Botanique.                              |
| GIRARD, ✱ A. ....      | Chimie biologique.                      |
| MANGEOT, ✱ A. ....     | T. P. 4 <sup>e</sup> , quatrième année. |
| PIETTE, ✱ A. ....      | Biologie animale.                       |
| RENAULT H., ✱ A. ....  | Chimie analytique.                      |
| DESVIGNES .....        | Microbiologie.                          |

## INSTITUT DE PHARMACOTECHNIE ET DE PHARMACODYNAMIE

|                          |                               |
|--------------------------|-------------------------------|
| MM. GOUTAREL, ✱ A. ....  | Pharmacotechnie galénique.    |
| QUEVAUVILLER, ✱ A. ..    | Pharmacodynamie.              |
| WAROLIN .....            | Pharmacotechnie chimique.     |
| Bibliothécaire en chef.. | M. GARNIER, ✱, ✱ I.           |
| Bibliothécaires .....    | M <sup>lle</sup> LAVAUD, ✱ I. |
|                          | M <sup>me</sup> KREHMER.      |



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41552216\\_0015](https://archive.org/details/IA41552216_0015)

Université de Paris - Faculté de Pharmacie.  
Année scolaire 1953-1954.  
Série n°

CONTRIBUTION A L'ETUDE DU GLYCOGENE

INTRA-LEUCOCYTAIRE.

SON IMPORTANCE AU COURS DE LA PHAGOCYTOSE.

T H E S E

Pour l'obtention du Grade de Docteur en Pharmacie

(Diplôme d'Université)

Présentée et soutenue le

1953

par

Claude AVICE.

Pharmacien

Diplômé des Certificats d'Etudes Supérieures de  
Bactériologie - Sérologie - Hématologie - Parasitologie.

Mademoiselle S. LAMBIN, Président

Monsieur G. VALETTE, Professeur

Monsieur A. GERMAN, Maître de Conférences.



A MA FEMME,

Pharmacien de la Faculté de Paris.

A LA MEMOIRE DE MES GRANDS-PARENTS,

A MON PERE,

Pharmacien de la Faculté de Paris,  
Chevalier de la Légion d'Honneur,

Mon premier maître qui m'a initié  
aux études pharmaceutiques et qui  
m'a inculqué le goût du travail,

et A MA MERE,

en témoignage de mon amour filial  
et de ma profonde reconnaissance  
pour leur exemple et leur inlassable  
dévouement.

A MA GRAND'MERE,

A MON BEAU-PERE,  
Chevalier de la Légion d'Honneur.

A MA BELLE-MERE,

A MON FRERE,  
Docteur en Médecine,

A MA BELLE-SOEUR,

A MES ONCLES ET TANTES

A TOUTE MA FAMILLE,

Bien affectueux témoignage.

MEIS ET AMICIS.

A Monsieur M. RADAIS,

Doyen honoraire de la Faculté de Pharmacie,  
Commandeur de la Légion d'Honneur,  
Membre de l'Académie de Médecine.

en témoignage de ma respectueuse  
gratitude pour tous ses conseils  
et son aimable sollicitude.

A Mademoiselle S. LAMBIN,

Professeur à la Faculté de Pharmacie,

à qui je dois le sujet de cette thèse,  
dont la bienveillante direction m'a permis  
de réaliser ce travail, et qui m'a fait  
l'honneur de présider le jury de cette thèse.

A Monsieur G. VALETTE,

Professeur à la Faculté de Pharmacie  
Chevalier de la Légion d'Honneur,

qui a bien voulu faire partie du  
jury de cette thèse,  
en hommage de mon profond respect.

A Monsieur A. GERMAN,

Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie,

qui a bien voulu faire partie du  
jury de cette thèse,  
en hommage de ma très respectueuse  
gratitude.

A Mademoiselle S. BAZIN,

Docteur en Pharmacie  
Chargée de recherches au C.N.R.S.

qui m'a toujours guidé avec tant  
de bienveillance.

A Monsieur le Docteur A. DELAUNAY,

Chef de Laboratoire de Pathologie expérimentale  
à l'Institut Pasteur,

auprès duquel j'ai toujours trouvé  
un constant appui et qui nous a aidés  
de ses précieux conseils pour l'éla-  
boration de cet ouvrage.

## INTRODUCTION.

Claude Bernard, continuant les travaux de son maître Magendie, avait montré l'existence de glucose dans de nombreuses cellules animales (tissus de mollusques, épithéliums, cartilages, etc.); le premier, il avait mis en évidence l'importance du métabolisme glucidique dans l'organisme, et l'existence du glycogène "générateur de sucre" dans le foie. Après lui, les travaux de Pasteur et Meyerhoff montrèrent que le glycogène constituait la source énergétique de la contraction musculaire. Enfin, au fur et à mesure du développement des recherches biochimiques, tant en physiologie qu'en immunologie, on découvrit l'importance des polyholosides. Ces constituants cellulaires jouent souvent un rôle primordial, aussi bien dans le fonctionnement des organismes supérieurs, que dans celui des organismes unicellulaires, et dans le pouvoir pathogène des bactéries. Dans le sang, on a reconnu la présence de glycogène, puis on s'est aperçu que ce polyholoside est localisé dans les globules blancs. Grâce aux travaux histo-chimiques récents confirmés par les recherches de microchimie quantitative de R. WAGNER (87), on sait aujourd'hui que le glycogène est absent des myéloblastes; les myélocytes, au contraire, en contiennent une petite quantité; dans les polynucléaires mûrs, sa concentration est variable : relativement forte dans les polynucléaires du sang circulant, elle est encore plus élevée dans les leucocytes des exsudats. Cette surcharge glycogénique des leucocytes inflammatoires avait été remarquée depuis longtemps, au moyen de la coloration par l'iode donnée par ce polyholoside. Les techniques histo-chimiques modernes ont fourni des résultats analogues, et les microdosages récents de R. ROBINEAUX, S. BAZIN et A. DELAUNAY (5), ont permis d'apprécier quantitativement l'importance de la proportion de glycogène des polynucléaires d'exsudats; la teneur en glycogène des leucocytes inflammatoires est de trois à cinq fois supérieure à celle des leucocytes du sang circulant. Quelle est la signification d'une telle hyperglycogénèse au moment où le leucocyte quitte le courant sanguin ? On l'ignore encore, bien que diverses hypothèses aient été émises à ce sujet. Les anciens auteurs, frappés de l'abondance du glycogène dans les pus, où de nombreuses cellules sont en voie de lyse, avaient considéré ces deux phénomènes comme liés à la dégénérescence des leucocytes. Cependant cette opinion avait déjà été mise en doute par EHRLICH (32), puis plus tard par J. de HAAN (46) et R. WILLSTATER (93), pour ces auteurs, l'augmentation du métabolisme aboutissant à l'accumulation du glycogène intra-leucocytaire serait liée à un accroissement de l'activité cellulaire. Une telle hypothèse paraît plus satisfaisante, si l'on envisage le rôle important que les leucocytes inflammatoires vont avoir à jouer, lorsqu'ils ont franchi la paroi vasculaire. Cependant jusqu'à présent, aucune confirmation expérimentale n'a apporté un appui à l'une ou l'autre de ces théories. Pour notre part, nous avons été frappés par le fait que le glycogène apparaît avec une abondance particulière dans les cellules qui vont entrer en lutte contre les bactéries qui tentent d'envahir l'organisme. N'existerait-il

pas une relation entre la forte teneur glycogénique des leucocytes inflammatoires et la mise en oeuvre de leur pouvoir phagocytaire ?

Pour essayer de répondre à cette question, nous avons d'abord étudié le sort du glycogène intraleucocytaire au cours de la phagocytose de diverses bactéries (Staphylocoque, bacille du Charbon, bacille Typhique) puis nous nous sommes demandé si une modification préalable du taux du glycogène intra-leucocytaire pouvait retentir sur l'importance de la phagocytose, nous avons alors cherché quelle était l'intensité de la phagocytose d'une même bactérie par des leucocytes contenant, soit une quantité élevée de glycogène, soit au contraire une faible quantité de glycogène. Dans le premier cas, nous avons choisi des polynucléaires provenant d'animaux carencés en vitamine C car ces leucocytes se sont montrés comme particulièrement riches en glycogène. Dans le second cas, nous avons fait diminuer in vitro la teneur en glycogène de polynucléaires normaux, en bloquant leur métabolisme respiratoire, et nous avons comparé l'intensité de la phagocytose obtenue, dans les mêmes conditions, d'une part avec les leucocytes de teneur glycogénique normale, d'autre part avec les leucocytes de teneur glycogénique abaissée. Enfin, en analysant les résultats obtenus dans ces différents essais, nous avons essayé de dégager quelques notions sur le rôle du glycogène intraleucocytaire.

-----

L'exposé de notre travail comporte deux parties : dans la première, nous exposons les principales données bibliographiques sur la physiologie des polynucléaires, de manière à situer la question que nous avons étudiée dans l'ensemble des connaissances physiologiques et immunologiques concernant le rôle des polynucléaires; dans la seconde partie, nous exposons tout d'abord les techniques que nous avons utilisées pour nos recherches, puis successivement nos résultats expérimentaux concernant, d'une part la teneur en glycogène des leucocytes avant et après phagocytose, d'autre part l'importance de la phagocytose observée, soit chez les leucocytes à faible teneur glycogénique, soit chez les leucocytes particulièrement riches en glycogène.

Puis nous discutons nos résultats, en les intégrant aux données déjà acquises sur le problème du métabolisme des leucocytes dans leur activité phagocytaire.

°  
° °

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Paris, et au Laboratoire de Pathologie Expérimentale de l'Institut Pasteur de Garches.

Nous remercions profondément Mademoiselle le Professeur LAMBIN, pour l'aimable accueil qu'elle a bien voulu nous réserver dans son laboratoire; après nous avoir donné le sujet de cette thèse, elle n'a cessé de nous suivre dans nos efforts et de nous guider de ses conseils : elle nous a fait l'honneur de présider le Jury de cette thèse.

Nous prions Monsieur le docteur A. DELAUNAY, chef de Laboratoire de l'Institut Pasteur, qui s'est si vivement intéressé à ce travail, et nous a apporté l'appui de sa grande érudition et de sa foi en la recherche, d'agréer nos respectueux remerciements.

Nous remercions tout spécialement Mademoiselle S. BAZIN, chargée de recherches au C.N.R.S. : par son aide et son appui de tous les instants, elle nous a permis de surmonter les difficultés, tant théoriques que techniques, qui se sont présentées à nous au cours de ce travail.

Nous sommes heureux, enfin, d'exprimer notre très vive gratitude à Monsieur G. VALETTE, Professeur à la Faculté, et à Monsieur A. GERMAN, Maître de Conférences à la Faculté, qui ont bien voulu accepter de faire partie du Jury de cette thèse.

---oOo---



## CHAPITRE I.

### 1ère PARTIE.

#### CONSTITUTION CHIMIQUE ET METABOLISME DES POLYNUCLEAIRES.

Pour bien comprendre le fonctionnement d'une cellule vivante, et son rôle dans l'organisme, il est indispensable de connaître sa constitution chimique et physicochimique, ainsi que son métabolisme. Malgré les récents progrès de la biochimie cellulaire, bien des données nous manquent encore à l'heure actuelle dans ce domaine.

Néanmoins, les résultats obtenus apportent déjà quelque lumière sur la manière dont les constituants chimiques et enzymatiques d'une cellule peuvent intervenir dans son activité physiologique. Ce sont de tels résultats que nous nous proposons d'exposer, en essayant de montrer comment le métabolisme d'une cellule est intimement lié à ses caractères physiologiques.

#### Principaux constituants chimiques des polynucléaires :

Comme toute cellule vivante, les polynucléaires contiennent une forte proportion d'eau (80 %), une certaine quantité d'éléments minéraux, des constituants organiques, principalement des protides, des glucides. On pourrait évidemment leur appliquer tout ce que l'on sait de la constitution du cytoplasme vivant, mais il nous paraît plus important de signaler ce qui les distingue parmi les autres cellules. Nous retiendrons plus spécialement les résultats récents concernant leurs constituants organiques :

##### A. - PROTIDES :

Les protides sont les constituants les plus importants du protoplasme et de la substance nucléaire. Leur étude chez les polynucléaires est encore peu avancée.

a) Protides cytoplasmiques : Aucune recherche concernant les protides cytoplasmiques des polynucléaires n'a été encore effectuée. On sait seulement que le protoplasme contient, outre les protides de base, des nucléoprotéines dérivées de l'acide ribonucléique, celles-ci étant localisées d'après Van der BERGUE et HOFFMANN (84), dans les granulations neutrophiles.

b) Protides nucléaires : les polynucléaires sont particulièrement riches en nucléoprotéines, cette constatation due à B.O. THORELL (83), a été confirmée par les travaux récents de P. MANDEL, P. METAIS, S. CUNY (58) : ces auteurs ont montré que les noyaux des polynucléaires contiennent, à

côté d'une petite quantité d'acide ribonucléique, une proportion d'environ  $6,8.10^{-9}$  mgr d'acide désoxyribonucléique. Cette quantité paraît constante chez les leucocytes de différentes espèces de mammifères; elle est un peu plus élevée que celle trouvée dans les noyaux des cellules de tissus divers.

#### B. - LIPIDES :

Les lipides ont été caractérisés dans les polynucléaires par leur réaction histochimique au Noir Soudan. DISCOMBE (31) a montré qu'ils sont localisés dans les granulations spécifiques. Des études chimiques quantitatives ont été faites d'une part par WONG(96) et ses collaborateurs sur des cellules du sang humain et du sang de lapin, d'autre part par WONG et ROSSITER (74) sur les leucocytes inflammatoires de lapin. Ces recherches ont montré que la proportion de lipides totaux est de 16 à 18 mgr pour 100 mgr de leucocytes frais, soit une teneur en lipides quatre fois supérieure à celle des hématies. Parmi ces lipides, on trouve environ 30 % de graisses neutres, 60 % de phospholipides (caractérisé par une forte proportion de sphingomyéline et de céphaline) et 10 % d'esters du cholestérol et de cholestérol libre

#### C. - GLUCIDES :

Les polynucléaires contiennent des oses : des pentoses, entrant dans la constitution des acides nucléiques, des hexoses, dont le glucose et le fructose.

Parmi leurs constituants polysidiques, on n'a pas isolé de polyside spécifique, mais, comme nous l'avons déjà signalé, un fait frappant est leur forte teneur en glycogène. Notre travail ayant principalement porté sur ce constituant, nous étendrons un peu plus longuement sur son étude, tout d'abord d'un point de vue général, ensuite du point de vue particulier des leucocytes.

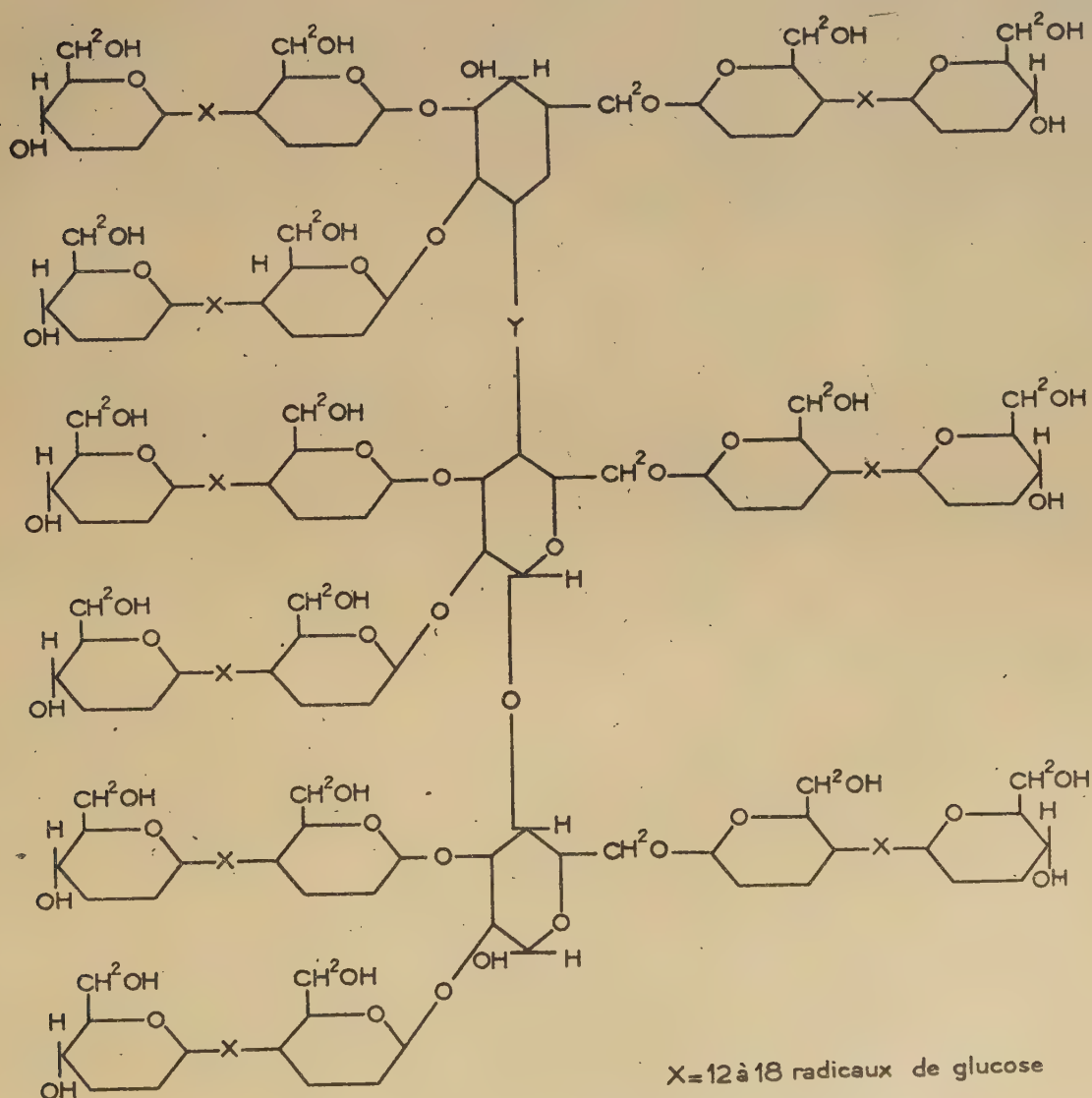
Le glycogène : Comme on le sait, les premières études concernant ce polyholoside sont dues à Cl. BERNARD (7 à 15); avant les découvertes de ce grand biologiste, on ne croyait pas que les animaux puissent former du sucre; par de remarquables expériences, il découvrit que le foie est le foyer de production du sucre et qu'il le déverse dans le sang. Il fut amené ensuite à rechercher quelle est la substance qui se transforme en sucre dans le foie : il avait remarqué que les extraits aqueux de cet organe présentaient une opalescence particulière; en y ajoutant de l'alcool, il vit se précipiter des flocons blancs d'une substance qui, à l'analyse, se montra analogue à l'amidon végétal. Cette matière était donc l'amidon animal, Cl. BERNARD l'appela : GLYCOGENE. Le glycogène se présente sous la forme d'une poudre blanche, amorphe, soluble dans l'eau avec accroissement de solubilité avec la température. La solution aqueuse a un aspect opalescent, et l'alcool le précipite du milieu. Il résiste aux alcalis même concentrés, mais les acides l'hydrolysent en plusieurs molécules de glucose.

Sa constitution chimique est très proche de celle de l'amidon : on considère actuellement qu'il est formé de nombreuses molécules de glucose, accolées de la façon suivante :

Le glycogène diffère cependant de l'amidon, par le fait qu'il résiste aux alcalis concentrés, et par la coloration brune qu'il donne avec l'iode.

Comment la dégradation du glycogène s'effectue-t-elle dans l'organisme et, en particulier, dans le muscle ? On pense actuellement que cette dégradation se fait par paliers grâce à des phosphorylations successives produites par des phosphorylases suivant le cycle de Pasteur - Meyerhoff dont nous donnons ci-dessous un schéma :

# GLYCOGENE



X=12 à 18 radicaux de glucose

Y=jusqu'à 100 radicaux



Comme on le voit, la dégradation du glycogène et sa phosphorylation produit l'énergie nécessaire à l'organisme : les termes ultimes de cette dégradation en aérobiose, sont :  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$ .

De nombreux facteurs agissent sur cette glycogénolyse : retenons seulement :

- les facteurs nerveux, démontrés par Cl. BERNARD au cours de ses expériences sur la piqûre du plancher du quatrième ventricule.
- les facteurs hormonaux : d'origine hypophysaire et surrénalienne, démontrés par les travaux modernes d'endocrinologie (4).

Dans les LEUCOCYTES, le glycogène avait été identifié depuis fort longtemps, grâce à la coloration brune produite dans les cellules par action d'un réactif iodo-ioduré.

P. SALMON (75) a fait une étude détaillée de la répartition de cette coloration dans les cellules du sang et des pus, et montré que la coloration des leucocytes sanguins est presque nulle, alors que celle des cellules du pus est fortement accusée.

Les méthodes histochimiques modernes, plus précises (3), reposent sur l'hydrolyse et sur l'oxydation du glycogène, soit par l'acide périodique, soit par l'acide chromique, réactifs qui agissent à la fois sur le glycogène libre (décelable par la coloration à l'iode), et sur le glycogène lié aux protéines (non décelable par l'iode).

Les fonctions aldéhydiques du glucose libérées au cours de la réaction sont alors utilisées pour fournir une réaction colorée, soit par réduction du nitrate d'argent (méthode de GOMORI) (42), soit par recoloration de la fuchsine bisulfitée (méthode de HOTCHKISS).

Les travaux récents de GIBBS (40), SMITH (78), WACHSTEIN (85), FRANKO (33), ont montré que, parmi les cellules sanguines, les polynucléaires sont les seules riches en glycogène. Ce polyholoside est localisé dans le cytoplasme, non pas sous forme granulaire, comme on l'avait tout d'abord admis, mais sous forme diffuse, l'aspect granulaire serait dû aux diverses granulations cytoplasmiques, qui ne réagissent pas avec les réactifs spécifiques du glycogène, et forment des plages incolores enserrant les nappes colorées de glycogène réparties dans un cytoplasme plus ou moins contracté sur les préparations fixées (R. ROBINEAUX, S. BAZIN, A. DELAUNAY) (72).

Les recherches histochimiques ont montré que le glycogène n'existe pas dans les myéloblastes, il est présent en faibles proportions dans les myélocytes et est d'une abondance certaine mais variable, chez les polynucléaires adultes. Ces résultats ont reçu une confirmation totale par les travaux de microchimie quantitative de R. WAGNER (87) : Cet auteur a constaté que tout le glycogène du sang est pratiquement localisé dans les polynucléaires; les faibles quantités de substances reductrices trouvées dans d'autres globules blancs et dans les thrombocytes paraissent bien être d'ori-

gine nucléo-protéique et ne proviennent pas du glycogène.

La teneur glycogénique des polynucléaires mûrs est variable. Non seulement on observe d'importantes variations individuelles, mais encore des variations selon les espèces. Ainsi, pour les leucocytes du sang, différents auteurs ont trouvé une moyenne de :

2,54  $\mu$  gr par million de cellules chez l'homme (86)

3,57  $\mu$  gr - - - le cheval (93)

3,14  $\mu$  gr - - - le chien (88)

1,36  $\mu$  gr - - - le lapin (89)

5,7  $\mu$  gr - - - le cobaye (71)

5,9  $\mu$  gr - - - le rat (5)

Les variations, selon le lieu d'origine des leucocytes, sont encore plus importantes.

Elles avaient déjà frappé les anciens auteurs qui n'utilisaient que la coloration par l'iode. L'étude de ces variations a fait l'objet de travaux récents qui ont montré que les leucocytes provenant du sang étaient moins riches en glycogène (5,7 $\mu$ gr) que ceux provenant d'exsudats inflammatoires (19  $\mu$ gr) chez le cobaye.

### Conclusion.

La chimie des leucocytes est encore incomplètement connue, malgré le nombre des travaux dont ils ont été l'objet du fait de leur facilité d'obtention qui en favorise beaucoup l'étude. Pour notre part nous retiendrons la richesse particulière en nucléoprotéines et en glycogène qui sont tous deux des métabolites des cellules physiologiquement très actives.

### 2ème PARTIE.

#### CARACTERES PHYSIOLOGIQUES DES POLYNUCLEAIRES.

Les leucocytes polynucléaires présentent deux caractères physiologiques essentiels : MOBILITE et POUVOIR PHAGOCYTAIRE.

Ces deux propriétés leur confèrent toute leur importance dans le processus de défense de l'organisme contre l'infection. Grâce à leur mobilité les polynucléaires arrivent au point exact où leur présence est nécessaire : ainsi rendus à pied d'oeuvre, ils pourront par phagocytose, d'une part, détruire les agents pathogènes, d'autre part débarrasser l'organisme des déchets cellulaires dus au vieillissement ou à la maladie.

## 1°) LA MOBILITE :

La mobilité des leucocytes a fait l'objet d'innombrables études depuis la simple observation microscopique jusqu'à la microcinématographie.

Cette propriété avait été très nettement démontrée "in vitro" par l'emploi de la technique de COMMANDON (23) basée sur le chimiotactisme positif des leucocytes pour certaines substances, en l'occurrence des grains d'amidon, technique qui sera décrite en détail dans le chapitre II.

A l'heure actuelle l'utilisation combinée du microscope à contraste de phase et du cinéma a permis l'étude intime du mécanisme de propulsion des leucocytes (73).

L'ensemble de ces travaux a mis en évidence la nature de la mobilité leucocytaire que l'on peut définir en ces termes : "mouvements amiboïdes orientés". Les leucocytes en effet, comme toutes les cellules mobiles, aussi bien végétales (algues, myxomycètes, anthérozoïdes de cryptogames...) qu'animales (amibes, infusoires ciliées...) se déplacent par mouvement amiboïde, avec émission de pseudo-podes cytoplasmiques, mouvement souvent conditionné par la présence de substances chimiotactiques, de nature glucidique (hexoses, polysides), ou protidiques (globulines, leucotaxines de MENKIN); le chimiotactisme est dit "positif" si le déplacement s'effectue vers les zones de concentration maxima, négatif dans le cas contraire. Parfois, cependant, le tactisme d'une même cellule, pour une substance donnée, varie avec la concentration, les cellules s'accumulent alors dans la zone de "concentration critique" pour laquelle le tactisme change de signe (20). Il va sans dire que la sensibilité aux différentes substances dissoutes varie considérablement avec l'origine des cellules; bien plus, des cellules, provenant d'un même animal, pourront réagir différemment à une même substance (phénomènes anaphyllactiques chez un animal sensibilisé).

L'émission de pseudopodes cytoplasmiques par le leucocyte est soumise à un certain nombre de facteurs, liés au milieu de suspension ou à l'état de la cellule.

1) Facteurs externes d'une part, et en premier lieu, présence d'un support solide : les leucocytes en suspension dans un liquide ne nagent pas, il leur faut rencontrer un point d'appui pour s'y accoler et ramper à sa surface.

La température également influe sur la mobilité. LEDINGHAM (54) a montré que l'optimum thermique est plus élevé pour les leucocytes d'animaux à sang chaud, (30° à 40°), que pour ceux des animaux poecilothermes, où il est voisin de la température optima de vie; d'après MADSEN et WULF (57), la mobilité disparaît rapidement dès que l'on dépasse un peu cette température optimum.

Citons enfin la lumière qui intervient surtout par les bandes se rapprochant de l'ultra-violet, ces radiations diminuant rapidement la mobilité cellulaire.

20) Le milieu dans lequel les leucocytes se trouvent en suspension joue évidemment aussi un grand rôle. L'isotonie au milieu d'extraction doit être respectée, le pH compris entre certaines limites avec un optimum entre 7,4 et 7,8, en outre on doit opérer en présence de sérum.

A. DELAUNAY et J. PAGES (24) (25) (26) ont montré que l'alexine et les ions  $\text{Ca}^{+}$  avaient aussi un rôle stimulant sur la phagocytose.

3) Etat de la cellule : Les corps chimiques dissous agissent aussi sur la mobilité (BAZIN et DELAUNAY) (6) : les anesthésiques à une concentration de M/100 inhibent la mobilité des cellules, cette inhibition est définitive lorsque la substance a pénétré d'une façon irréversible dans la cellule, dans le cas contraire, il suffit de laver les leucocytes pour qu'ils récupèrent leur mobilité.

Les barbituriques, à la concentration de M/20, agissent aussi, mais comme leur fixation semble se faire à la surface du cytoplasme, le mouvement reprend lorsque la substance chimique est éliminée.

Les anti-histaminiques, enfin, à la concentration de M/10, arrêtent la mobilité sans altérer la cellule.

Les effecteurs d'enzymes: ils agissent à dose et pH convenable, et suppriment totalement ou partiellement le déplacement chimiotactique des leucocytes, sans tuer les cellules (52).

#### D'autres facteurs interviennent encore:

a) La surface du cytoplasme doit être intacte : si elle est lésée ou si des substances étrangères se sont fixées à sa surface, la mobilité est entravée.

b) La charge électrique de la cellule qui doit être basse, la tension interfaciale avec le support qui, abaissée, augmente la mobilité (16).

c) Divers auteurs ont d'autre part observé que lorsque le cytoplasme de la cellule était surchargé par des microbes, la mobilité diminue pour cesser complètement lorsque le cytoplasme était rempli de particules (20). (bacille tuberculeux).

Comme on le voit, la mobilité des leucocytes est un phénomène très complexe, sensible à de nombreuses influences, et qui peut disparaître alors même que les cellules sont encore vivantes....

Nous allons à présent étudier l'autre grand point de la physiologie leucocytaire, intimement lié au premier : le pouvoir phagocytaire.

## 2°) LE POUVOIR PHAGOCYTAIRE :

On appelle phagocyte, toute cellule, libre ou fixée, capable d'appréhender de fines particules pour les englober dans son cytoplasme. Parmi

ces cellules, on peut distinguer, chez l'homme et les animaux, les phagocytes sanguins et les phagocytes tissulaires.

Les phagocytes sanguins comprennent les polynucléaires neutrophiles, et les grands mononucléaires; la propriété de phagocyter est beaucoup moins nette chez les polynucléaires acidophiles et basophiles, elle est presque nulle en ce qui concerne les lymphocytes. Tous ces phagocytes sont capables de quitter les vaisseaux sanguins pour passer dans les tissus et c'est généralement là, bien plus que dans le sang, qu'ils ont à exercer leur activité.

Ils rejoignent alors les phagocytes tissulaires, qui forment le système réticulo-endothélial, comprenant tout d'abord des cellules endothéliales spéciales et des cellules réticulaires qu'on rencontre dans divers organes (foie, rate, moelle osseuse, ganglions lymphatiques, etc..) Ces cellules ont une morphologie spéciale : elles forment la paroi de capillaires sanguins ou lymphatiques très anfractueux (sinusoïdes), leur cytoplasme est très abondant et elles possèdent à un haut degré la propriété de phagocyter. Dans le foie, les phagocytes fixes portent le nom de cellules de KUPFFER, elles sont accolées aux grandes cellules polyédriques du parenchyme hépatique. Le S.R.E. comprend encore d'autres éléments répandus dans le tissu conjonctif de tous les organes et spécialement abondants dans les tissus sous-épidermiques, il ne s'agit plus là de cellules fixées, mais de cellules mobiles ou facilement mobilisables : ce sont les histiocytes et les macrophages. Les histiocytes, cellules de forme générale allongée, émettent des pseudopodes aplatis en lames ondulantes et montrent un assez faible pouvoir phagocytaire. Elles peuvent se transformer en macrophages : d'aspect plus ou moins arrondi, de taille comprise entre 30 et 50  $\mu$ , susceptibles de phagocyter activement, aussi bien les bactéries et les protozoaires qui envahissent l'organisme que les éléments morts : cellules diverses, leucocytes, débris tissulaires, hématies..

La mise en évidence de la phagocytose peut se faire "in vivo". C'est METCHNIKOFF en 1884 qui réalisa les premières expériences sur des cellules d'invertébrés, puis, sur des cellules de vertébrés (lapin) (61 à 66). Ces procédés étant d'une application délicate, on chercha des techniques plus commodes en injectant une souche peu virulente de B. Anthracis sous la peau d'un cobaye ou d'un lapin, on provoque l'appel d'innombrables polynucléaires au point d'inoculation avec formation d'un oedème et on constate que, en prélevant ensuite un peu du liquide inflammatoire, les phagocytes se rendent aisément maîtres des bactéries qu'ils ont englobées.

On peut aussi provoquer un exsudat inflammatoire chez le cobaye, et recueillir le liquide produit qui contient de nombreux polynucléaires; ces cellules une fois isolées permettent l'étude "in vitro" de la phagocytose : c'est la technique que nous avons utilisée et qui sera décrite plus loin.

Le MECANISME de PHAGOCYTOSE est assez mal connu, bien que l'utilisation de films ait permis d'étudier l'accolement des particules au cytoplasme, puis leur englobement. On a pu ainsi constater (22) qu'une certaine

viscosité de la surface cellulaire semble entrer en jeu, plutôt que l'attraction résultant d'une différence de signe des charges électriques. Toutefois, les travaux de ABRAMSON (1), FENN (34), et PONDER (69, 70) ont montré que des bactéries à charge électrique basse quoique de même signe que les leucocytes étaient plus facilement phagocytées. BERRY, STARR et HALLER (16) faisant agir du tween sur des bactéries, ont constaté que la phagocytose s'élevait de 50 %, ce qui semble bien démontrer l'action de la tension superficielle (67). Lorsque la particule a été englobée dans le cytoplasme, par émission de pseudopodes, tout se passe d'ailleurs comme si ces derniers se propageaient progressivement sur la particule pour la mouiller complètement.

Ainsi englobée, la matière phagocytable se trouve en plein cytoplasme, sans interposition d'un liquide quelconque, puis peu à peu, on voit se creuser autour d'elle une vacuole remplie de suc cellulaire; lorsque la matière est indigestible, elle reste inaltérée au sein du phagocyte, dans le cas contraire, elle subit une digestion intracellulaire qui peut amener sa complète destruction, indubitablement causée par les enzymes présents dans le suc vacuolaire.

Les leucocytes ont un équipement enzymatique complet qui ont donné lieu à de nombreuses recherches, toutefois, nous n'entrerons pas dans beaucoup de détail à leur sujet, car il s'agit de travaux déjà anciens dont beaucoup demanderaient à être repris par des techniques modernes (séparation et purification des enzymes grâce aux méthodes d'absorption de WILLSTATER, mise en évidence des enzymes par des techniques applicables à l'histochemie de LINDERSTRÖM-LANG) et d'autre part les équipements enzymatiques ne comportent aucun élément qui puisse être considéré comme vraiment caractéristique des éléments à fonction phagocytaire. Toutefois, il est évident qu'en dehors des enzymes qui assurent la digestion des germes englobés, ce sont des réactions diastasiques qui fournissent à la cellule l'énergie nécessaire à l'accomplissement du travail phagocytaire.

Les diastases mises en évidence sont : des Oxydases (95) directes ou des peroxydases localisées dans les granulations neutrophiles et à leur surface.

des hydrolases (37), peptidases (94), trypsine, pepsine, catépsine (93) à action limitée dans une zone de pH bien déterminée. Ces hydrolases sont plus ou moins abondantes, suivant l'espèce considérée : il y en a plus chez l'homme que chez le cobaye.

des lipases, parmi lesquelles une esterase agissant sur les triglicérides, et les esters d'acides gras, de p.m faibles à 18 atomes de carbone, elle est donc du type esterase et non pancréatique (39) (74).

des phosphatases qui ont été localisées histochemiquement d'une part dans le noyau, ce sont des pyrophosphatases acides. Ce sont toutes des phosphomonoestérases, elles sont huit fois plus abondantes chez le lapin que chez l'homme (71)(85)(91).

des carboxylases. On trouve plusieurs amylases qui ont été étudiées par

WILLSTATER, des lyoamylases et trois desmoamylases liées aux protides cytoplasmiques, elles sont activées par les ions Calcium (94).

WILLSTATER et ROHDEWALD ont caractérisé en outre une saccharase et une maltase, et WAGNER a mis en évidence une hexokinase, une phospho-isomérase, une phosphoglycomutase, comparables aux enzymes semblables isolées dans le foie (91).

L'une des enzymes précédemment citées, une protease offre un intérêt spécial dans la défense de l'organisme, du fait qu'à côté de son action sur les protéines bactériennes, elle liquéfie les tissus morts dans les foyers de suppuration; libérée à la mort des leucocytes, elle permet au pus de se faire jour en traversant les tissus. Cette protéinase agit en milieu faiblement alcalin.

Malgré le nombre et la diversité des enzymes existant dans le cytoplasme des polynucléaires, il peut arriver que certaines bactéries (Bacille tuberculeux, Gonocoques) soient englobées et non digérées, elles peuvent alors se multiplier au sein des leucocytes, dans ce cas, tantôt les cellules restent vivantes et peuvent en se déplaçant contribuer à la dispersion des bactéries dans l'organisme, tantôt elles sont tuées, et libèrent sur place les germes englobés. Il est à noter que l'on ne constate pas de corrélation entre la résistance à l'englobement et la résistance à la digestion.

Nous citerons enfin une substance non enzymatique mais qui contribue à la destruction des bactéries et à leur digestion : le lysozyme contenu dans les polynucléaires, et doué d'une assez forte action antibiotique.

#### Différents facteurs interviennent au cours de la Phagocytose.

- degré de maturation du leucocyte : on a pu constater en effet que la phagocytose, nulle chez le myéloblaste, apparaissait chez le myélocyte, le phénomène ne prenant toute son ampleur que chez les cellules adultes.
- Etat du sujet qui a fourni les leucocytes : en particulier son équilibre vitaminique et hormonal.
- Les carences en vitamines, en particulier en Vitamine A (44) : les travaux de GUGENHEIM et de BUECHER ont montré que la carence en vitamine A perturbe le mécanisme de fabrication des anticorps et la phagocytose du Salmonella Typhi murium. Au cours de cette thèse, nous avons nous-mêmes étudié l'action de la carence en vitamine C.
- De même les animaux soumis à un régime sans protéines SAKO (76) et STEFFEE (82) phagocytent beaucoup moins que des animaux normaux témoins.
- Enfin, on a constaté (38) que la phagocytose diminue chez les animaux thyroïdectomisés (27) et que l'évolution d'infections à staphylocoques dorés serait influencée d'une façon défavorable par la cortisone (51).

Pour étudier la phagocytose in vitro, il est nécessaire tout d'abord que les leucocytes aient une bonne vitalité (46). J. de HAAN a étudié la persistance de la vitalité des leucocytes dans différents milieux liquides et a montré que dans du sérum homologue non dilué, la vitalité persistait pendant 5 jours, par contre, dans la solution de RINGER, il y a perte du pouvoir phagocytaire et mort en un à deux jours. La probabilité de contact entre les bactéries et le phagocyte intervient aussi : dans un milieu agité doucement le chimiotactisme n'intervient pas et le contact dépend du hasard et la phagocytose est proportionnelle au nombre de chocs entre cellules et particules. De même, une phagocytose massive inhibe l'ingestion des particules. En résumé, la probabilité de collision dépend de la taille des particules et varie comme la somme des carrés des diamètres des cellules et des particules, et dans le cas de tubes agités de la vitesse relative des cellules et des particules. A nombre de collisions égales, FERMI (35) (36) pense que la phagocytose dépend de la nature des particules à englober. Le quartz est plus difficile à phagocyter que le carbone. De plus le contact est favorisé par les propriétés chimiotactiques vis-à-vis des substances destinées à être phagocytées, les leucocytes, par exemple, étant plus attirés par  $MnO_2$  phagocyteront plus  $MnO_2$  que  $MnSiO_3$ .

Des conditions strictes de température doivent aussi être respectées (54) J.C.G. LEDINGHAM (57), F. MADSEN et O. WULF ont tout spécialement étudié l'action de ce facteur : ils ont montré que la phagocytose du Staphylocoque s'élève régulièrement de  $18^\circ$  à  $37^\circ$  et que l'optimum de température était celui du corps de l'animal dont provenaient les leucocytes ( $37^\circ$  homme,  $39^\circ$  cobaye,  $41^\circ$  pigeon,  $40^\circ$  pour malades fiévreux).

Divers autres facteurs peuvent aussi avoir une action, en particulier, le lieu de prélèvement des leucocytes, ceux du sang phagocytant moins que ceux provenant d'exsudats inflammatoires. Le blocage de la respiration par le CNK ne perturbe pas, contrairement aux exemples précédents, le mécanisme de la phagocytose. Ce qui prouve que les leucocytes possèdent un équipement enzymatique capable de produire de l'énergie en quantité suffisante dans des conditions anaérobies.

Suivant les Germes mis en présence, les leucocytes agissent très différemment :

Si l'on introduit des Staphylocoques dans l'organisme, l'appel des polynucléaires est considérable; les globules blancs s'accumulent en masse dans les espaces intercellulaires du tissu infecté, et beaucoup ne tardent pas à mourir, du fait de la précarité de la nourriture et de l'action des leucocydines et exotoxines des staphylocoques. C'est pourquoi ce germe est très pyogène et difficile à éliminer malgré qu'il soit généralement bien phagocyté.

La virulence du germe a aussi une action très nette.

Si on inocule une souche virulente de charbon (Bacillus Anthracis) sous la peau d'un cobaye, on voit se développer un volumineux oedème dans lequel les bacilles pullulent, et où les polynucléaires sont presque complè-

tement absents, les rares cellules présentes ne phagocytent pour ainsi dire pas. Au contraire, une souche peu virulente provoque rapidement l'appel de polynucléaires qui phagocytent abondamment et se rendent maîtres de l'infection. De même, en injectant au cobaye du bacille diphtérique pathogène, l'absence de phagocytose au point injecté permet une rapide diffusion de la toxine et entraîne la mort de l'animal. Dans le cas des bacilles tuberculeux très inégalement virulents pour les différentes espèces animales, il existe un parallélisme certain entre la résistance de l'organisme à une espèce bacillaire donnée et la capacité qu'ont les phagocytes à s'en rendre maîtres: METCHNIKOFF a montré comment les phagocytes de la gerbille, animal particulièrement résistant à la tuberculose, détruisent le bacille de Koch, au contraire, dans le cas d'espèces sensibles, la résistance du bacille à la phagocytose est extrêmement grande.

Pour le bacille E. TYPHI, enfin, la phagocytose n'est pas la même s'il s'agit d'une souche rough ou smooth, et dans les deux cas elle devient spectaculaire lorsqu'elle se produit en présence d'immunsérum spécifique.

La phagocytose de bactéries traitées par des antiseptiques ou des antibiotiques est aussi considérablement augmentée (30).

En terminant ce chapitre, nous étudierons l'action du MILIEU dans lequel s'effectue la phagocytose.

L'isotonie tout d'abord doit être respectée. La phagocytose de particules de carbone par des leucocytes de sang de cheval est normale dans du sérum pur et diminue de  $1/3$  dans du sérum à 30 %, de  $2/3$  dans du sérum dilué à 50 % et nulle au delà; les cellules, laissées 60' dans ces dilutions, remises dans du sérum normal retrouvent leur activité phagocytaire primitive la phagocytose maxima se produit donc dans les solutions isotoniques du sang (80).

L'action des ions dissous a aussi été étudiée par HAMBURGER (50) : l'isotonie du milieu peut être réalisée indifféremment par NaCl ou NaBr mais NaI diminue la phagocytose. Le fluor, le citrate de Sodium et les ions  $SO_3$  abaissent aussi le % de phagocytose, par contre la présence d'ions  $Ca^{+}$  (28) élève la phagocytose. Le chlorure de Baryum et le fluorure de Sodium sont toxiques pour les leucocytes, le chlorure de lithium de M/1000 à M/100.000 a une action favorisante.

Les substances organiques liposolubles et en particulier les substances tensioactives, qui modifient la tension interfaciale entre les leucocytes et le milieu agissent en augmentant la phagocytose aux faibles concentrations et la diminuent aux fortes : PONDER (69).

Quant au rôle des protides sériques, il est capital : si l'on fait in vitro des expériences sur la phagocytose d'un germe donné, ceci dans les milieux suivants, eau physiologique, sérum, sérum enrichi en complément (28), immunsérum spécifique, on constate que : la phagocytose faible en eau physiologique, augmente en sérum normal, et plus encore si le sérum est riche en complément; en présence d'immunsérum, la phagocytose est massive. Ce dernier fait tout spécialement spectaculaire a été démontré par

METCHNIKOFF (64) et BORDET (21), en injectant du streptocoque virulent dans la cavité péritonéale d'un cobaye, on ne constate une phagocytose que dans le cas où un animal a été préalablement vacciné. WRIGHT et NEUFELD ont cherché à voir si cette action favorisante était due à une atteinte des germes ou à une exaltation du pouvoir phagocytaire des leucocytes; leurs travaux montrent qu'il se développe dans le sérum des opsonines ou des bactériotropines, agissant sur les bactéries et favorisant la phagocytose. Cette action se rapproche de celle des anticorps spécifiques présents dans les immunsérums, et il semble actuellement démontré que les opsonines sont des anticorps O fixés à la surface des bactéries.

Rappelons brièvement pour terminer la nature et le rôle des anticorps dans la phagocytose, anticorps produits dans l'organisme lorsque vient à pénétrer dans le milieu intérieur une substance particulière, l'"antigène" correspondant à cet anticorps. Les anticorps peuvent agir comme une précipitine : formation d'un complexe antigène anticorps insoluble comme une agglutinine : agglutination des bactéries par fixation des anticorps sur les antigènes correspondants de la surface bactérienne, ou comme une hémolysine. Les antigènes bactériens sont de plusieurs sortes : tout d'abord les toxines des bactéries (exotoxines et endotoxines sont antigéniques et les anticorps qui leur correspondent sont antigéniques : ce sont des antitoxines). D'autres substances antigènes tapissent la surface des corps bactériens (antigènes somatiques O) ils conditionnent en grande partie le pouvoir vaccinant et la virulence des germes, ou adhèrent aux flagelles des bactéries mobiles : antigènes H. Tous deux sont doués de propriétés agglutinantes : l'antigène O correspondant à l'endotoxine. Parmi les autres antigènes somatiques nous citerons l'antigène Vi, considéré comme plus externe que O, ayant son pouvoir agglutinant et vaccinant mais pas de toxicité.

Tous les anticorps produits dans l'organisme sous l'action de ces antigènes ont une action nette sur les germes bactériens, mais cette action est très rarement directement lytique, elle est plutôt indirecte car elle favorise la capture et la dégradation des germes par les phagocytes. Cette capture étant d'ailleurs plus ou moins facile selon la souche microbienne considérée : en l'absence de tout anticorps, la forme S (smooth) est bien moins aisément phagocytable que la forme R (rough), d'autre part l'intervention de l'anticorps O homologue rend beaucoup plus facile la phagocytose de la forme S (19), de plus, le complément favorise encore cette phagocytose. C'est cette propriété que nous avons utilisée lors de notre étude de la phagocytose du bacille Typhique.

### Conclusion.

Dans les pages qui précèdent, nous avons tenté de résumer les grands traits de la physiologie leucocytaire, si complexe en raison des nombreux facteurs qui la gouvernent; un certain nombre de ces points restent encore dans l'ombre, que fréquemment de nouvelles publications viennent éclaircir.

Nous avons pour notre part étudié le rapport entre la composition chimique du cytoplasme, en particulier la teneur en glycogène, et la phagocytose. Pour obtenir des résultats comparables, entre eux, nous avons dû utiliser des techniques rigoureuses et bien définies; ce sont ces techniques que nous nous proposons à présent d'exposer.

## CHAPITRE II

### T E C H N I Q U E S

Dans ce chapitre, nous exposons les techniques de base ayant servi nos expériences. On y trouvera :

1°) Le mode d'obtention des leucocytes polynucléaires à partir du cobaye :

- a) Production d'un exsudat inflammatoire.
- b) Numération des polynucléaires.

2°) La technique de phagocytose "in vitro" employée :

- a) La mise en suspension des bactéries et leur numération.
- b) Les conditions expérimentales de la phagocytose.

3°) La méthode de dosage du glycogène :

- a) Prélèvement de l'exsudat en vue du dosage.
- b) Isolement du glycogène.
- c) Précipitation du glycogène.
- d) Purification du glycogène.
- e) Hydrolyse pour transformer le glycogène en glucose.
- f) Titrage du glucose par la méthode de SOMOGYI.
- g) Calculs.

-----

### lère PARTIE.

#### OBTENTION DES SUSPENSIONS DE LEUCOCYTES POLYNUCLEAIRES A PARTIR DU COBAYE :

a) Production d'un exsudat inflammatoire.

Au cours de nos travaux, nous avons utilisé la technique des exsudats inflammatoires décrite par BORDET (21), pour obtenir les leucocytes polynucléaires qui nous étaient nécessaires. Nous avons employé des cobayes

mâles ou femelles, d'un poids moyen de 350 grammes, provenant d'un élevage homogène (1).

Nos expériences ont porté, d'une part sur des animaux normaux sains, d'autre part sur des animaux scorbutiques, carencés en vitamine C après vingt et un jours d'un régime comportant uniquement avoine, son et eau. Les résultats obtenus ont montré l'homogénéité des lots d'animaux utilisés; toutefois, nous avons observé des variations saisonnières du taux de glycogène leucocytaire, variations dues sans doute à des modifications du métabolisme, en rapport avec les variations de régime alimentaire et de l'équilibre hormonal.

L'exsudat inflammatoire a été produit par injection de bouillon à l'extrait de viande préparé de la façon suivante : on dissout à feu doux 5 grammes d'extrait de viande Liebig dans 100 cc d'eau, on laisse refroidir, on ajoute 10 grammes de peptone Chapoteau et 5 grammes de chlorure de sodium, on ajuste au pH désiré, on filtre, on stérilise à l'autoclave à 117° pendant 5 minutes, on filtre à chaud sur papier Chardin plissé mouillé, on répartit et stérilise de nouveau à 115° durant 20 minutes. Nous avons injecté dans le péritoine du cobaye successivement 8 cc et 6 cc de ce bouillon à 3 heures d'intervalle. Les injections provoquent la formation d'un exsudat par afflux de leucocytes dans la cavité péritonéale; ces leucocytes, se déplaçant par diapédèse, ont, en effet, franchi le septum endothélial des capillaires, et, cheminant à travers les espaces conjonctifs, s'accumulent en plus ou moins grand nombre dans l'exsudat inflammatoire. On assiste parallèlement chez ces leucocytes à une augmentation de la teneur en glycogène qui passe de  $5,7 \mu$  g (pour les leucocytes du sang circulant) à une valeur moyenne de  $11,6 \mu$  gr (71). Le prélèvement est effectué 2 heures après la deuxième injection au moyen d'une longue pipette Pasteur, introduite par une petite incision dans le péritoine. L'exsudat recueilli doit être de couleur beige clair; et, s'il est sanglant, il doit être rejeté. Il contient habituellement environ 8000 leucocytes au  $\text{mm}^3$  et très peu d'hématies. Par centrifugation lente et brève, on obtient un culot blanc de leucocytes, comprenant environ 85 % de polynucléaires neutrophiles; ce culot est remis en suspension, soit dans du sérum de cobaye, soit dans une solution isotonique suivant les besoins de l'expérimentation.

#### b) Numération des leucocytes polynucléaires.

La numération de ces leucocytes a été effectuée par la méthode classique, sur une dilution au 1/100 obtenue avec une pipette capillaire de Potain; comme liquide de dilution, nous avons utilisé le liquide de Hayem de formule suivante :

|                        |                       |
|------------------------|-----------------------|
| Bleu de méthylène..... | 0,05 gr               |
| Acide acétique .....   | 1,0 cm <sup>3</sup>   |
| Eau distillée .....    | 200,0 cm <sup>3</sup> |

- 1) Nous tenons à ce sujet à remercier tout spécialement Monsieur le Docteur A. DELAUNAY, chef du Laboratoire de Pathologie Expérimentale, à l'Institut Pasteur, qui nous a si obligeamment fourni nos animaux d'expérience.

Pour la numération proprement dite, nous avons employé la cellule de Thomas, qui offre des avantages certains : précision élevée, facilité de nettoyage. En général, nous avons amené nos suspensions leucocytaires à une concentration voisine de : 20.000/mm<sup>3</sup>.

## 2ème PARTIE.

### TECHNIQUE DES PHAGOCYTOSES "IN VITRO" EMPLOYEE.

#### a) Mise en suspension des bactéries; leur numération.

La phagocytose par les polynucléaires neutrophiles des bactéries mises en expérience, a été effectuée de la façon suivante: nous avons émulsionné, dans du sérum frais de cobaye dilué au 1/2, le culot leucocytaire provenant de la centrifugation de l'exsudat, de manière à obtenir une concentration en cellules d'environ 20.000 par millimètre cube; nous avons ensuite ajouté un volume égal d'une suspension en eau physiologique du germe à phagocyter provenant d'une culture de 24 heures. Au préalable, le nombre de germes avait été déterminé par la méthode de numération de Friess. A partir de cette suspension étalon, nous avons établi une courbe des variations de la densité optique en fonction du nombre des bactéries, en utilisant le diffusio-absorpsiomètre de Dognon. Cette courbe, établie une fois pour toutes, pour chaque germe, est utilisée ensuite pour déterminer le nombre de germes d'une suspension par mesure de sa densité optique, ce qui évite de répéter chaque fois la numération par les levures, opération qui compliquerait et prolongerait inutilement les manipulations. Nous garantissons ainsi la constance de notre suspension bactérienne, point sur lequel Bhatnagar insiste tout particulièrement.

Enfin, pour les différents germes employés, nous avons effectué des dosages sur 1 cm<sup>3</sup> de suspension (quantité prise pour le dosage), nous nous sommes ainsi assurés que ces suspensions ne contenaient pas de quantité dosable de glycogène.

Le mélange des suspensions leucocytaire et bactérienne est effectué par agitation, les deux liquides étant introduits dans un tube à centrifuger de 45 cm<sup>3</sup>, et le tout porté à l'étuve à 37°, pendant 30 minutes, temps choisi après essais préliminaires, comme permettant une phagocytose suffisante mais non excessive.

Après incubation, les tubes sont décantés avec précaution et le culot est délicatement prélevé à l'aide d'un petit tampon de coton monté sur fil de platine; on fait alors des frottis sur lame qu'on fixe rapidement à la flamme, puis on colore au bleu de Loëffler pendant 3 minutes. Les frottis colorés sont lavés, séchés et examinés au microscope, à l'objectif à immersion.

L'intensité de la phagocytose a été évaluée :

1° - En établissant le pourcentage des leucocytes polynucléaires ayant pha-

gocyte dans un temps fixé à 30', c'est-à-dire le nombre de cellules pour 100 ayant englobé des bactéries, sans tenir compte du nombre de celles-ci (HAM-BURGER) (50).

2° - Dans quelques cas seulement par la méthode des Index, c'est-à-dire en déterminant le nombre moyen des bactéries englobées pour cent cellules (DES-VIGNES : Thèse Pharmacie) (30), méthode plus précise mais difficilement applicable dans le cas de nos expériences où nous avons cherché, en général, à obtenir de fortes phagocytoses, pour bien mettre en évidence la consommation de glycogène.

### 3ème PARTIE.

#### DOSAGE DU GLYCOGENE.

Nous avons utilisé les techniques mises au point par S. BAZIN (4, 5) d'après la méthode de PFLUGER modifiée par R. WAGNER (87).

##### a) Prélèvement des prises d'essai :

Le volume de suspension leucocytaire, mesuré exactement à la pipette jaugée, prélevé après agitation dans le centre du tube, doit contenir de 5 à 30 millions de leucocytes par cm<sup>3</sup>. Ce prélèvement est versé dans un tube à centrifugation en verre Pyrex, d'un volume de 35 cc environ. Les tubes sont fermés par des capsules à vis en aluminium rendues étanches par des rondelles de caoutchouc d'un diamètre approprié, et qui ont été reconnues comme n'apportant au cours de l'hydrolyse aucun élément susceptible de troubler le dosage. Tous ces tubes ont été lavés au mélange sulfochromique, rincés 5 fois à l'eau ordinaire, puis 2 fois à l'eau distillée et séchés.

##### b) Isolement et hydrolyse du glycogène. (technique de P. Flüger).

Le prélèvement une fois effectué, on procède à l'hydrolyse alcaline pour détruire les substances cellulaires et libérer le glycogène dont la molécule est stable en présence d'alcalis et à chaud.

On doit employer une hydrolyse alcaline, car une hydrolyse acide (43) donnerait naissance à une quantité importante de substances réductrices ne provenant pas du glycogène et venant s'ajouter à celles normalement produites par l'hydrolyse acide de ce dernier. Nous avons opéré de la façon suivante :

- le contenu de chaque tube est additionné de deux fois son volume de potasse à 30 %; après agitation, les tubes sont placés dans un récipient métallique et maintenus au bain-marie bouillant pendant une heure, temps suffisant pour liquéfier les cellules.

c) Précipitation du glycogène :

Lorsque l'hydrolyse alcaline est terminée, on précipite le glycogène du milieu; pour cela après refroidissement à la température du laboratoire, on ajoute, en agitant constamment, un volume d'alcool à 96° égal au double du volume total (prélèvement des liquides biologiques + potasse); le glycogène se trouve alors en milieu alcoolique à 70°, dans lequel il est insoluble. On porte ensuite les tubes au bain-marie bouillant jusqu'à commencement d'ébullition de l'alcool, ceci dans le but de favoriser la floculation des particules colloïdales de glycogène et de faciliter la précipitation (technique de Cori) (92). Les tubes sont alors mis à la glacière et laissés au repos durant au moins 12 heures, pratiquement une nuit.

d) Purification du glycogène :

Après séjour à la glacière, les tubes sont centrifugés pendant 20 minutes, à 6.000 tours par minute. On décante avec précaution, en conservant le culot de glycogène. On dissout par trituration le culot dans 3 cc d'eau bi-distillée bouillante, puis on ajoute 6 cc d'alcool à 96°. Cette opération terminée, on laisse de nouveau 12 heures à la glacière en repos : le glycogène précipite. On élimine ainsi les substances solubles dans l'alcool à 70°. La seconde purification se fera de la même manière, mais avec une centrifugation de 15' seulement; on laisse reposer une heure à la glacière. Le culot de glycogène d'abord légèrement coloré en jaune, doit devenir parfaitement blanc, le liquide surnageant étant incolore.

e) Hydrolyse du glycogène :

Après les purifications, le glycogène qui se trouve à l'état de précipité dans l'alcool, est isolé par une nouvelle centrifugation de 15' à 6.000 tours/minute, puis décanté et séché en chauffant légèrement au bain-marie. On dissout le culot par simple agitation dans 5 cc d'acide sulfurique normal demi. Les tubes sont alors bouchés avec leurs capsules étanches et placés au bain-marie bouillant pendant 3 heures.

L'hydrolyse acide dépolymérise le glycogène et le transforme en glucose qu'on dosera par la suite.

f) Titration du glucose formé :

Les tubes, retirés du bain-marie après hydrolyse acide, sont refroidis à la température du laboratoire et ouverts avec précaution. Le liquide acide est alors neutralisé, après adjonction de II gouttes de Rouge de phénol en solution alcoolique à 0,4 %, par la soude concentrée (III à IV gouttes) puis diluée (soude N et finalement N/10); le volume est complété avec de l'eau bi-distillée, à 10 cc pour chaque tube. Le liquide ne doit contenir aucune particule solide étrangère, qui troublerait le dosage. On prélève 5 cc de chaque solution sur lesquels on dose le glucose par la méthode de SOMOGYI (79, 80, 81).

Pour les micro-dosages SOMOGYI a utilisé la formule suivante :

|                                                |                       |
|------------------------------------------------|-----------------------|
| - Carbonate de Sodium anhydre.....             | 25 gr                 |
| - Tartrate double de Sodium et de Potassium... | 25 gr                 |
| - Sulfate de cuivre cristallisé .....          | 4 gr                  |
| - Bicarbonate de Sodium .....                  | 20 gr                 |
| - Sulfate de Sodium anhydre .....              | 20 gr                 |
| - Iodure de potassium .....                    | 1 gr 50               |
| - Solution normale d'iodate de Potassium ..... | 6 cm <sup>3</sup>     |
| - Eau bi-distillée qs pour .....               | 1.000 cm <sup>3</sup> |

Après essais, étant donné la teneur moyenne de nos hydrolysats en glucose, nous avons modifié la formule en abaissant le nombre de cm<sup>3</sup> solution normale d'iodate de Potassium à 4 cm<sup>3</sup>. Ce réactif est préparé de la façon suivante :

- On dissout le bicarbonate de Sodium et le tartrate double dans environ 800 cm<sup>3</sup> d'eau bi-distillée, et le sulfate de Cuivre dans 40 cm<sup>3</sup> d'eau bi-distillée. On mélange les deux solutions, on ajoute ensuite le bicarbonate de Sodium et le sulfate de Sodium, puis l'iodure de Potassium. On porte à l'ébullition pendant 30 minutes; on refroidit et l'on ajoute la solution normale d'iodate de Potassium. On complète à 1000 cm<sup>3</sup> avec de l'eau bi-distillée, on laisse reposer 24 heures, on filtre. On conserve à l'obscurité.

Ce réactif a donné de bons résultats dans les dosages des sucres réducteurs dans les milieux biologiques. La précision atteinte dans le dosage iodométrique est telle que les seules causes d'erreur sont celles provenant de la composition du réactif et des conditions d'oxydation du sucre. Cette méthode paraît préférable à la technique de HAGEDORN, JENSEN (48), qui dose l'ensemble des substances réductrices agissant sur le ferri-cyanure présentes dans le milieu étudié; ou à celle de FOLIN et WU qui est plus simple, mais comporte une marge d'incertitude plus grande. SHAFFER et SOMOGYI (77) ont en effet montré que l'une des meilleures méthodes pour le dosage de ces sucres était celle qui utilise les sels de cuivre avec titrage iodimétrique.

- Action de l'alcalinité : plus l'alcalinité est faible, plus l'oxydation du sucre est lente, mais plus le pourcentage final d'oxydation est élevé.

- Cuivre : la quantité de cuivre contenue dans le réactif, limite sa capacité d'oxydation; mais un grand excès n'en élève pas beaucoup le pourcentage. C'est pourquoi il est préférable d'utiliser un réactif contenant assez peu de cuivre et de diluer les solutions trop concentrées en glucose.

- Iodate de Potassium : il sert à produire une quantité d'iode connue, libérée lorsque la solution est acidifiée. Il ne réagit pas en solution alcaline, et n'a pas d'action sur l'oxydation du sucre, il doit être en excès par rapport à la quantité nécessaire pour oxyder l'oxyde cuivreux. La quantité d'iodure et d'iodate contenue dans le réactif limite sa capacité.

- Tartrate de Sodium et de Potassium : sert à maintenir le Cuivre en solution à l'état de complexe.

- Iodure de Potassium : il a un triple rôle.

1) réactif iodométrique suivant la réaction (en milieu acide)



2) avant le titrage il favorise la réoxydation de l'oxyde cuivreux.

3) c'est un agent stabilisateur du réactif.

Pour la suite du dosage, on opère de la façon suivante : à 5 cm<sup>3</sup> de solution provenant de l'hydrolyse du glycogène (contenant de 10 à 500  $\mu$ gr de glucose) on ajoute 5 cm<sup>3</sup> de réactif de SOMOGYI dans un tube de Pyrex de 25 mm sur 200 mm. On couvre chaque tube et on maintient exactement 20 minutes au bain-marie bouillant. Après ce temps la réduction du cuivre est terminée; on refroidit les tubes à la température de 30°, en évitant toute agitation pour ne pas redissoudre l'oxydure de Cuivre.

On ajoute 5 cm<sup>3</sup> d'acide sulfurique normal, on attend de 5 à 10 minutes, puis on agite jusqu'à dissolution complète de l'oxydure de Cuivre et fin du dégagement gazeux. Il apparaît alors une coloration jaune due à la libération d'iode en quantité inversement proportionnelle à celle du glucose initialement présent dans la solution.

On titre alors cet iode à la micro-burette avec de l'hyposulfite normal/200 en ajoutant 11 gouttes d'empois d'amidon à la fin du titrage. On fait à chaque dosage un titrage témoin sur 5 cm<sup>3</sup> d'eau bi-distillée ou mieux sur 5 cm<sup>3</sup> d'une solution saline de même concentration que le prélèvement de solution à titrer (voir réactifs à la fin de ce chapitre). L'hyposulfite sera chaque fois titré de la façon suivante :

- ( 2 cm<sup>3</sup> de Solution d'iodure de Potassium à 2,50 gr/cent
- ( 2 cm<sup>3</sup> d'acide acétique à 3/100
- ( 2 cm<sup>3</sup> de solution d'iodate de Potassium normal/200

- le titre de l'hyposulfite doit être peu différent de 1, soit pour le titrage une quantité voisine de deux centimètres cubes.

#### g) Calculs :

Soit : ( t = le titre de l'hyposulfite (titré à chaque dosage)  
(  
( y = nombre de centimètres cubes d'hyposulfite du titrage  
) à blanc  
(  
) x = nombre de centimètres cubes d'hyposulfite lu sur la  
( microburette

on a : ( y - x ) t = nombre de cm<sup>3</sup> d'hyposulfite réellement consommé dans la prise d'essai.

On en déduit la quantité de glucose d'après une courbe construite à

partir de titrages effectués sur des solutions de glucose de titre connu (voir fin du chapitre); le chiffre trouvé sur la courbe correspond au nombre de microgrammes par centimètre cube de prise d'essai.

On exprime les résultats en microgrammes de glucose par million de leucocytes, en tenant compte du chiffre trouvé lors de la numération des leucocytes contenus dans la prise d'essai et du volume de celle-ci

#### REACTIFS

a) Solution d'iodate de potassium N/200 :

|                                           |                      |
|-------------------------------------------|----------------------|
| (Iodate de potassium pur et anhydre ..... | 0,5566 gr.           |
| ) Eau bi-distillée q.s. pour .....        | 2000 cm <sup>3</sup> |

b) Solution d'hyposulfite de Sodium :

Préparer une solution d'hyposulfite N/10 à 24,80 gr pour 1000 Cc.  
Diluer au moment de l'emploi.

|                                           |                      |
|-------------------------------------------|----------------------|
| (Solution d'hyposulfite de sodium N/10 .. | 5 Cm <sup>3</sup>    |
| ) Eau bi-distillée q.s. pour .....        | 1000 Cm <sup>3</sup> |

Cette solution est titrée avant usage.

c) Réactif amidonné :

Emploi d'amidon à 10 %, fait à chaud dans une solution de Cl Na saturé.

d) Solution saline pour dosage :

On neutralise une solution normale d'acide sulfurique par une solution normale puis décimale de soude en présence de rouge de phénol.

N.B. 1° Pour chaque dosage, avec le matériel et les réactifs utilisés, nous avons effectué un dosage à blanc.

2° Toute la verrerie servant au dosage a été lavée au mélange sulfochromique.

#### PREPARATION DES SOLUTIONS DE GLUCOSE ET COURBE DE TITRAGE.

Dessécher du glucose pur à 70° pendant 3 heures. Peser 1 gramme exactement. Dissoudre dans une quantité d'eau bi-distillée suffisante pour obtenir un volume total de 100 cm<sup>3</sup>. Diluer cette solution mère au 1/10 puis au 1/100 en utilisant la solution saline. On obtient ainsi une solution à 100  $\mu$  gr par cm<sup>3</sup>, en diluant une partie de celle-ci au 1/5, on a une solution à 20  $\mu$  gr par cm<sup>3</sup>.

A partir des solutions à 20  $\mu$  gr et 100  $\mu$  gr par  $\text{cm}^3$ , on prépare des prises d'essais contenant : 30  $\mu$  gr, 50  $\mu$  gr, 80  $\mu$  gr, 100  $\mu$  gr, 150  $\mu$  gr, 200  $\mu$  gr, 250  $\mu$  gr de glucose, en opérant de la façon suivante :

| Sol. à 20 $\mu$ gr | Sol. à 100 $\mu$ gr | Solution saline   | Teneur de la prise d'essai |
|--------------------|---------------------|-------------------|----------------------------|
|                    | 2,5 $\text{cm}^3$   | 2,5 $\text{cm}^3$ | 250 gr                     |
|                    | 2                   | 3                 | 200                        |
|                    | 1,5                 | 3,5               | 150                        |
|                    | 1                   | 4                 | 100                        |
| 4 $\text{cm}^3$    |                     | 1                 | 80                         |
| 2,5                |                     | 2,5               | 50                         |

A l'aide de ces solutions étalons, on dose le réactif de SOMOGYI et l'on trace une courbe en portant en abscisse le nombre de  $\mu$ gr de glucose par prise d'essai, et en ordonnée le nombre de centimètres cubes de réactif de SOMOGYI utilisé; normalement la courbe reliant les 6 points obtenus est une droite.

### CHAPITRE III

#### LA GLYCOGENOLYSE AU COURS DE LA PHAGOCYTOSE.

Comme nous l'avons montré précédemment, les modifications chimiques qui accompagnent la phagocytose ou qui sont déterminées par elle sont encore assez mal connues; on sait à peu près quel est l'équipement enzymatique des leucocytes polynucléaires, mais on ne saisit pas clairement le rôle des diverses diastases; il en va de même pour la plupart des substances intracytoplasmiques.

Dans la première partie de ce chapitre, nous nous proposons d'examiner le problème suivant : la teneur en glycogène des leucocytes est-elle modifiée au cours de la phagocytose ?

En cas de réponse positive, nous étudierons dans une deuxième partie l'importance de la variation du taux du glycogène en fonction de l'importance de la phagocytose.

#### 1ère PARTIE

#### PHAGOCYTOSE ET VARIATION INTRA-LEUCOCYTAIRE DE LA TENEUR EN GLYCOGENE.

Nous avons étudié la phagocytose :

- a) d'un coccus Gram + : *Staphylococcus albus*.
- b) d'un bacille Gram + : *Bacillus anthracis*.
- c) d'un bacille Gram - : *Eberthella typhi*.

Nous avons utilisé plusieurs bactéries afin d'être sûrs qu'une consommation éventuelle de glycogène n'est pas propre à une espèce bactérienne mais bien générale à toute phagocytose.

#### a) Phagocytose de *Staphylococcus albus* :

Pour mettre en évidence la consommation de glycogène au cours de la phagocytose d'un *Staphylocoque* blanc, nous avons opéré suivant la technique exposée au chapitre I.

On effectue les mélanges suivants dans trois tubes :

|                                                                                        | n° I | n° II | n° III |
|----------------------------------------------------------------------------------------|------|-------|--------|
| Suspension de leucocytes .....                                                         | 1 cc | 1 cc  | 1 cc   |
| Eau physiologique .....                                                                | 1 cc |       |        |
| Susp. de <i>Staphylocoques</i> en eau<br>physiologique (800 millions/cm <sup>3</sup> ) |      | 1 cc  | 1 cc   |

(Volumes mesurés à la pipette jaugée à 2 traits).

Les tubes n° I, II et III sont portés à l'étuve à 37° pendant 30 minutes, ce temps, après essai, ayant été jugé le meilleur. Après le séjour à l'étuve, les tubes n° I et II reçoivent 4 cc de potasse à 30 %, puis ils sont portés au bain-marie bouillant. Ultérieurement on effectue le dosage du glycogène suivant la technique indiquée dans le premier chapitre.

En plaçant ainsi à l'étuve les deux tubes sur lesquels nous nous proposons de doser le glycogène, nous évitons toute erreur pouvant provenir de la variation du taux de ce corps pendant les 30 minutes d'étuve. Cette variation est d'ailleurs insignifiante, ainsi que nous l'ont montré des essais à ce sujet; résultats concordant avec ceux de WILLSTATER et ROHDEWALD (94).

Le tube n° III sert à faire des frottis sur lames pour étudier la phagocytose.

Nous avons obtenu les résultats suivants : (voir tableau n° 1).p.36

Ces résultats mettent en évidence une diminution du Glycogène intra-cellulaire chez les leucocytes ayant phagocyté le staphylocoque.

Pour une phagocytose moyenne de 82 %, le taux de glycogène s'est abaissé de 20,8 % par rapport au glycogène contenu initialement dans les cellules.

#### b) Phagocytose de Bacillus Anthracis.

Il nous a paru intéressant d'étudier la phagocytose d'un germe capsulé; à cet effet, nous avons choisi Bacillus Anthracis sur lequel des études avaient déjà été faites (18).

Nous avons opéré de la même façon que pour le Staphylocoque. La souche utilisée était facilement émulsionnable après culture, pendant 24 heures sur gélose; les suspensions faites dans l'eau physiologique contenaient 700 millions de germes par centimètre cube.

Nous avons déterminé la teneur des leucocytes en glycogène :

L°) Après un séjour à l'étuve de 30 minutes, mais en l'absence de tout germe.

II°) Après phagocytose à l'étuve à 37° pendant 30 minutes, comme dans le cas du staphylocoque.

D'après les résultats résumés dans le tableau n°2, p.37, on constate que, dans tous les cas, la teneur en glycogène des leucocytes qui ont phagocyté le Bacillus anthracis est inférieure à celle des leucocytes témoins. Pour une phagocytose moyenne de 79 %, la consommation de glycogène a été de 21% par rapport au glycogène présent initialement dans les leucocytes.

TABLEAU n° 1.

Phagocytose du Staphylocoque et consommation du glycogène

| Glycogène en $\mu$ gr par<br>million de leucocytes. |                   | % de glycogène<br>utilisé | Importance de la<br>phagocytose % |
|-----------------------------------------------------|-------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| avant phagocytose                                   | après phagocytose |                           |                                   |
| 11.3 $\mu$ gr                                       | 10.0 $\mu$ gr     | 11.5 %                    | 96 %                              |
| 11.3 $\mu$ gr                                       | 10.0 $\mu$ gr     | 11.8 %                    | 97 %                              |
| 13.1 $\mu$ gr                                       | 10.9 $\mu$ gr     | 17.0 %                    | 97 %                              |
| 13.5 $\mu$ gr                                       | 12.2 $\mu$ gr     | 8.9 %                     | 71 %                              |
| 13.5 $\mu$ gr                                       | 11.0 $\mu$ gr     | 20.0 %                    | 80 %                              |
| 13.6 $\mu$ gr                                       | 11.0 $\mu$ gr     | 19.1 %                    | 92 %                              |
| 13.9 $\mu$ gr                                       | 11.6 $\mu$ gr     | 15.1 %                    | 75 %                              |
| 14.0 $\mu$ gr                                       | 12.0 $\mu$ gr     | 14.6 %                    | 65 %                              |
| 14.0 $\mu$ gr                                       | 10.0 $\mu$ gr     | 28.5 %                    | 73 %                              |
| 16.7 $\mu$ gr                                       | 11.6 $\mu$ gr     | 30.5 %                    | 94 %                              |
| 18.5 $\mu$ gr                                       | 15.6 $\mu$ gr     | 16.8 %                    | 78 %                              |
| 19.1 $\mu$ gr                                       | 11.0 $\mu$ gr     | 42.3 %                    | 96 %                              |
| 19.4 $\mu$ gr                                       | 16.3 $\mu$ gr     | 16.0 %                    | 71 %                              |
| 20.0 $\mu$ gr                                       | 15.5 $\mu$ gr     | 27.5 %                    | 91 %                              |
| 21.5 $\mu$ gr                                       | 20.0 $\mu$ gr     | 7.0 %                     | 81 %                              |
| 23.6 $\mu$ gr                                       | 19.4 $\mu$ gr     | 17.8 %                    | 97 %                              |
| 28.0 $\mu$ gr                                       | 25.4 $\mu$ gr     | 9.4 %                     | 62 %                              |
| 29.8 $\mu$ gr                                       | 29.5 $\mu$ gr     | 1.1 %                     | 68 %                              |
| 32.4 $\mu$ gr                                       | 10.9 $\mu$ gr     | 66.5 %                    | 98 %                              |
| 32.5 $\mu$ gr                                       | 21.4 $\mu$ gr     | 34.0 %                    | 58 %                              |
| Moyennes: 19.0 $\mu$ gr                             | 14.8 $\mu$ gr     | 20.77 %                   | 82 %                              |

TABLEAU n° 2.

Phagocytose du B. Anthracis et consommation du glycogène

| Glycogène en $\mu$ gr par million de leucocytes. |                   | % de glycogène utilisé | Importance de la phagocytose % |
|--------------------------------------------------|-------------------|------------------------|--------------------------------|
| avant phagocytose                                | après phagocytose |                        |                                |
| 13. $\mu$ gr                                     | 9.5 $\mu$ gr      | 24.2 %                 | 80 %                           |
| 13.7 $\mu$ gr                                    | 12.2 $\mu$ gr     | 11.0 %                 | 78 %                           |
| 13.6 $\mu$ gr                                    | 11.9 $\mu$ gr     | 12.5 %                 | 70 %                           |
| 11.2 $\mu$ gr                                    | 5.8 $\mu$ gr      | 47.0 %                 | 67 %                           |
| 12.4 $\mu$ gr                                    | 9.7 $\mu$ gr      | 21.6 %                 | 90 %                           |
| 10.5 $\mu$ gr                                    | 9.1 $\mu$ gr      | 13.3 %                 | 87 %                           |
| 12.4 $\mu$ gr                                    | 9.7 $\mu$ gr      | 21.6 %                 | 79 %                           |
| $\sigma = \pm 1,18$                              |                   | $\sigma = \pm 2,18$    |                                |

c) Phagocytose de Eberthella Typhi.

Les deux germes précédemment étudiés sont spontanément phagocytés, le bacille Typhique Smooth au contraire, n'est phagocyté qu'en présence d'immunsérum (29).

Nous avons utilisé Eberthella Typhi souche Smooth (souche 0,91 I.P et l'immunsérum correspondant (1).

Nous avons opéré de la façon suivante :

|                                                                       | n° I   | N° II  | N° III |
|-----------------------------------------------------------------------|--------|--------|--------|
| Suspension de Leucocytes .....                                        | 0,5 cc | 0,5 cc | 0,5 cc |
| Sérum normal au 1/10 .....                                            | 0,5 cc |        |        |
| Immunsérum au 1/10 .....                                              |        | 0,5 cc | 0,5 cc |
| Eau physiologique .....                                               | 1 cc   |        |        |
| Suspension de Bacilles typhiques en eau physiologique (1 milliard cc) |        | 1 cc   | 1 cc   |

1) Nous tenons à remercier ici Monsieur le Docteur LE MINOR, chef de laboratoire à l'Institut Pasteur, qui nous a si obligeamment procuré les souches et l'immunsérum.

- (Tube n° I = dosage du taux du glycogène avant phagocytose  
 (Tube n° II = - - - - - après - - -  
 (Tube n° III = Permet d'étudier la phagocytose sur frottis.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

TABLEAU n° 3.

Phagocytose de Eberthella Typhi et consommation du glycogène

| Glycogène en $\mu$ gr par<br>million de leucocytes. |                   | % de glycogène<br>utilisé | Importance de la<br>phagocytose % |
|-----------------------------------------------------|-------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| avant phagocytose                                   | après phagocytose |                           |                                   |
| 10.7 $\mu$ gr                                       | 8.6 $\mu$ gr      | 19.6 %                    | 75 %                              |
| 11.6 $\mu$ gr                                       | 7.9 $\mu$ gr      | 32.0 %                    | 80 %                              |
| 9.3 $\mu$ gr                                        | 5.2 $\mu$ gr      | 44.0 %                    | 89 %                              |
| 13.1 $\mu$ gr                                       | 11.7 $\mu$ gr     | 10.7 %                    | 80 %                              |
| 14.0 $\mu$ gr                                       | 11.6 $\mu$ gr     | 17.2 %                    | 87 %                              |
| 15.5 $\mu$ gr                                       | 12.6 $\mu$ gr     | 18.2 %                    | 86 %                              |
| Moy: 12.3 $\mu$ gr                                  | 9.6 $\mu$ gr      | 23.7 %                    | 83 %                              |

$$\sigma = \pm 2,3$$

$$\sigma = \pm 2,83$$

L'examen de ce tableau montre, comme pour les germes précédemment étudiés, que la phagocytose du bacille typhique s'accompagne d'une diminution de la teneur en glycogène des leucocytes polynucléaires.

Pour une phagocytose moyenne de 83 %, la consommation de glycogène a été de 23,7 % du glycogène initial.

2ème PARTIE.

LA BAISSSE DU TAUX DE GLYCOGENE EST-ELLE PROPORTIONNELLE A LA PHAGOCYTOSE ?

Dans la deuxième partie de ce chapitre, nous recherchons plus spécialement s'il existe un rapport entre l'importance de la phagocytose et les variations de la teneur en glycogène des leucocytes polynucléaires; autrement dit, la consommation de glycogène de la cellule est-elle d'autant

plus forte que la phagocytose est plus accusée ?

Nous avons utilisé deux méthodes :

1) Nous avons placé des leucocytes en présence de suspensions microbiennes inégalement riches; nous avons choisi le *Staphylococcus albus* à raison de 400 millions de germes et de 2 milliards par centimètre cube; nous avons ainsi, pour un même germe, obtenu une phagocytose variable dans son intensité avec des leucocytes provenant d'un même animal.

2) Nous avons opéré avec *Eberthella Typhi*, bacille difficilement phagocytable. Prenant des leucocytes d'un même animal, nous avons réalisé la phagocytose d'une part en présence d'immunsérum; d'autre part, sans immunsérum; nous avons ainsi obtenu deux valeurs différentes pour la phagocytose, élevée dans le premier cas, faible dans le second.

#### a) Phagocytose de *Staphylococcus albus*.

Nous avons utilisé deux suspensions de germes à des concentrations différentes :

- suspension concentrée de Staphylocoques : 2 milliards/cc
- suspension diluée de Staphylocoques : 400 millions/cc.

Le protocole des expériences est le même que celui déjà précédemment indiqué :

|                            | N° I | N° II | N° III | N° IV | N° V |
|----------------------------|------|-------|--------|-------|------|
| suspension de leucocytes   | 1 cc | 1 cc  | 1 cc   | 1 cc  | 1 cc |
| eau physiologique.....     | 1 cc |       |        |       |      |
| Staphylo. susp. concentrée |      | 1 cc  | 1 cc   |       |      |
| Staphylo. susp. diluée..   |      |       |        | 1 cc  | 1 cc |

- Tube n° 1 - Mesure du taux initial de glycogène
- Tube n° II - Dosage du glycogène après forte phagocytose
- Tube n° III- Lame pour examen de la phagocytose
- Tube n° IV - Dosage du glycogène après faible phagocytose
- Tube n° V - Frottis pour examen de la phagocytose (pourcentage)

Nous avons obtenu les résultats suivants (ils concernent quatre animaux) :

TABLEAU n° 4

Phagocytose du Staphylocoque à des concentrations différentes

|     | Glycogène en $\mu$ gr |                            |                           | % de glycogène utilisé     |                          | Importance de la phagocytose |                          |
|-----|-----------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|
|     | avant                 | après                      | après                     | St. 400<br>millions/<br>cc | St. 2<br>milliards<br>cc | St. 400<br>millions/<br>cc   | St. 2<br>milliards<br>cc |
|     | p h a g o c y t o s e |                            |                           |                            |                          |                              |                          |
|     | (témoin)              | St. 400<br>millions/<br>cc | St. 2<br>milliards/<br>cc |                            |                          |                              |                          |
| C.1 | 26.0 $\mu$ gr         | 25.0 $\mu$ gr              | 22.6 $\mu$ gr             | 0.76 %                     | 13.0 %                   | 6 %                          | 24 %                     |
| C.2 | 21.2 $\mu$ -          | 19.4 $\mu$ -               | 19.0 $\mu$ -              | 8.5                        | 10.3                     | 16 %                         | 50 %                     |
| C.3 | 14.9 $\mu$ -          | 11.6 $\mu$ -               | 10.7 $\mu$ -              | 22.0                       | 28.2                     | 67 %                         | 90 %                     |
| C.4 | 23.0 $\mu$ -          | 19.0 $\mu$ -               | 14.3 $\mu$ -              | 17.4                       | 37.8                     | 76 %                         | 100 %                    |

Le Cobaye n° 1 présente une phagocytose très faible : 6 % avec la suspension diluée; avec la suspension concentrée la phagocytose est plus élevée : 24 %; le pourcentage de glycogène utilisé varie lui aussi : 0,76 % dans le premier cas, 13 % dans le second. Egalement pour le deuxième animal on a, d'une part, une faible consommation de glycogène et une faible phagocytose, d'autre part, une consommation de glycogène plus élevée avec une phagocytose plus élevée (8,5 % - 16 %; 10,3% - 50 %). On constate le même parallélisme chez les cobayes n° 3 et 4.

b) Importance relative de la consommation de glycogène pour des phagocytoses inférieures ou supérieures à 75 %.

A la suite des résultats précédents qui montrent une diminution du pourcentage de glycogène utilisé lorsque le pourcentage de cellules phagocytaires diminue lui-même, il nous a paru intéressant de réunir en deux tableaux les résultats déjà exposés dans la première partie de ce chapitre, en groupant d'une part les phagocytoses supérieures à 75 %, d'autre part les phagocytoses inférieures à 75 % (voir tableaux n° 5 et 6).

L'examen de ces deux tableaux montre que pour une phagocytose moyenne de 66.0 % le pourcentage de glycogène utilisé est en moyenne de 12,3 % alors qu'à une phagocytose moyenne de 91 % correspond un pourcentage de glycogène utilisé égal à 24 %, donc, à phagocytose plus élevée correspond une consommation de glycogène plus grande.

TABEAU n° 5

Phagocytose du Staphylocoque blanc  
Moyenne des phagocytoses supérieures à 75 %

| Glycogène en $\mu$ gr par<br>million de leucocytes |                   | % de<br>glycogène<br>utilisé | Importance<br>de la<br>phagocytose % |
|----------------------------------------------------|-------------------|------------------------------|--------------------------------------|
| avant phagocytose                                  | après phagocytose |                              |                                      |
| 11.3 $\mu$ gr                                      | 10.0 $\mu$ gr     | 11.5 %                       | 97 %                                 |
| 11.3 $\mu$ gr                                      | 10.0 $\mu$ gr     | 11.8                         | 97                                   |
| 13.1 $\mu$ gr                                      | 10.9 $\mu$ gr     | 17.0                         | 97                                   |
| 13.6 $\mu$ gr                                      | 11.0 $\mu$ gr     | 20.0                         | 80                                   |
| 13.6 $\mu$ gr                                      | 11.0 $\mu$ gr     | 19.1                         | 92                                   |
| 16.7 $\mu$ gr                                      | 11.6 $\mu$ gr     | 30.5                         | 94                                   |
| 18.5 $\mu$ gr                                      | 15.6 $\mu$ gr     | 16.8                         | 78                                   |
| 19.1 $\mu$ gr                                      | 11.0 $\mu$ gr     | 42.3                         | 96                                   |
| 20.0 $\mu$ gr                                      | 15.5 $\mu$ gr     | 27.5                         | 91                                   |
| 21.5 $\mu$ gr                                      | 20.0 $\mu$ gr     | 7.0                          | 81                                   |
| 23.6 $\mu$ gr                                      | 19.4 $\mu$ gr     | 17.8                         | 97                                   |
| 32.4 $\mu$ gr                                      | 10.9 $\mu$ gr     | 66.8                         | 98                                   |
| 17.9 $\mu$ gr                                      | 13. $\mu$ gr      | 24. %                        | 91.4 %                               |

TABEAU n° 6

Phagocytose du Staphylocoque blanc  
Moyenne des phagocytoses inférieures à 75 %

| Glycogène en gr par<br>million de leucocytes |                   | % de<br>glycogène<br>utilisé | Importance<br>de la<br>phagocytose % |
|----------------------------------------------|-------------------|------------------------------|--------------------------------------|
| avant phagocytose                            | après phagocytose |                              |                                      |
| 13.5 $\mu$ gr                                | 12.3 $\mu$ gr     | 8.9 %                        | 71 %                                 |
| 14.0 $\mu$ gr                                | 12.0 $\mu$ gr     | 14.6                         | 65                                   |
| 19.4 $\mu$ gr                                | 16.3 $\mu$ gr     | 16.0                         | 71                                   |
| 28.0 $\mu$ gr                                | 25.4 $\mu$ gr     | 9.4                          | 62                                   |
| 29.8 $\mu$ gr                                | 29.5 $\mu$ gr     | 1.1                          | 68                                   |
| 32.5 $\mu$ gr                                | 21.4 $\mu$ gr     | 34.0                         | 58                                   |
| 22.8 $\mu$ gr                                | 19.4 $\mu$ gr     | 12.3 %                       | 66 %                                 |

$$\sigma = \pm 7,9$$

$$\sigma = \pm 7,1$$

c) Phagocytose de Eberthella Typhi.

Nous avons utilisé Eberthella Typhi souche 0.91 en suspension aqueuse à raison de 1 milliard de germes par centimètre cube. Nous avons, pour chaque expérience, réalisé deux phagocytoses différentes, l'une avec immunsérum, l'autre sans immunsérum.

Le mode opératoire a été le même que pour les expériences précédentes : durée de la phagocytose : 30 minutes à l'étuve, mais nous avons suivi le schéma ci-dessous :

|                             | n° I | n° II | n° III | n° IV | n° V |
|-----------------------------|------|-------|--------|-------|------|
| Suspension de leucocytes    | 0,5  | 0,5   | 0,5    | 0,5   | 0,5  |
| Sérum normal dilué au 1/10  | 0,5  | 0,5   | 0,5    |       |      |
| Immunsérum dilué au 1/10    |      |       |        | 0,5   | 0,5  |
| Eau physiologique.....      | 1    |       |        |       |      |
| Emulsion de Eberthel. Typhi |      | 1     | 1      | 1     | 1    |

Tube n° I : dosage du glycogène sans phagocytose  
 Tubes II et IV : dosage du glycogène après phagocytose  
 Tubes III et V : examen microscopique de la phagocytose.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

TABLEAU n° 7

Phagocytose de Eberthella Typhi.

| Glycogène en gr |                    |           | % de glycogène utilisé |                     | Importance de la phagocytose |      |
|-----------------|--------------------|-----------|------------------------|---------------------|------------------------------|------|
| avant           | a p r è s          |           | immunsérum             |                     | immunsérum                   |      |
| μ gr            | sans               | avec      | sans                   | avec                | sans                         | avec |
| 10.7 μ gr       | 10.2 μ gr          | 8.6 μ gr  | 4.6 %                  | 19.6 %              | 36 %                         | 75 % |
| 11.6 μ gr       | 10.0 μ gr          | 7.9 μ gr  | 13.8                   | 32.0                | 34                           | 80   |
| 9.3 μ gr        | 8.6 μ gr           | 5.2 μ gr  | 7.5                    | 44.0                | 32                           | 89   |
| 13.1 μ gr       | 12.1 μ gr          | 11.7 μ gr | 6.3                    | 10.7                | 12                           | 80   |
| 14.0 μ gr       | 13.8 μ gr          | 11.6 μ gr | 1.4                    | 17.2                | 29                           | 87   |
| 15.5 μ gr       | 14.8 μ gr          | 12.6 μ gr | 8.0                    | 18.2                | 30                           | 86   |
| 12.3 μ gr       | 11.5 μ gr          | 9.6 μ gr  | 6.9 %                  | 23.7 %              | 29 %                         | 83 % |
|                 | $\sigma = \pm 2,3$ |           |                        | $\sigma = \pm 2,83$ |                              |      |

La différence de consommation de glycogène entre les leucocytes ayant peu phagocyté (29 %) et les leucocytes à phagocytose élevée (83 %) est ici nettement visible : le taux de consommation passe de 6,9 à 23,7 %. Si l'on compare les phagocytoses, évaluées par l'index phagocytaire, la différence est encore plus nette (voir tableau 8).

### 3ème PARTIE.

#### 1°) Discussion des résultats rapportés dans la première partie du Chapitre (II)

a) Au cours de notre étude sur la phagocytose, nous avons utilisé trois germes différents. Ceux-ci se distinguent à la fois par leur forme, leur mobilité, leurs propriétés sinchoriales, etc. Pour nous, un caractère très important est leur facilité à être absorbés par les phagocytoses : Staphylocoque et B. Anthracis sont spontanément et aisément phagocytés; E. typhi de souche Smooth ne l'est que très faiblement.

A quoi est due cette différence ? Selon ce que nous avons vu au 2ème Chapitre de notre première partie, on peut penser qu'il s'agit d'une différence de constitution de la surface microbienne. E. Typhi smooth est recouvert d'une couche d'antigène O (antigène glucido-lipidique de Boivin) qui a la propriété d'empêcher l'englobement des bactéries par le cytoplasme des polynucléaires. Pour que la phagocytose se produise normalement, il est indispensable que la surface bactérienne soit modifiée par absorption d'une couche d'anti-corps O, d'où la nécessité d'ajouter au milieu un immunosérum riche de cet anticorps.

Dans le cas du Staphylocoque et du B. Anthracis, on peut penser que la surface bactérienne est différente et que le pouvoir opsonisant des sérums normaux est suffisant pour en assurer la phagocytose.

Pour tous les germes étudiés, malgré les différences que présente leur englobement par les polys, la phagocytose s'est constamment manifestée comme accompagnée d'une glycogénolyse appréciable. On peut donc admettre que le phénomène est d'ordre général.

b) Ce point, une fois établi, l'examen comparatif des phagocytoses moyennes obtenues et des consommations moyennes de glycogène (82 %, 79 %, 83 %) montre que, pour des phagocytoses peu différentes, on a des glycogénolyses (21,7 %, 21,6 %, 23,7 %) du même ordre de grandeur. On observe cependant des différences sensibles dans les résultats individuels, ce qui pourrait les rendre suspects d'erreur.

Aussi avons-nous établi les rapports critiques entre les moyennes du taux de glycogène avant et après phagocytose; nous avons obtenu les chiffres suivants :

- ( Expériences sur Staphylococcus albus (tableau 1)...  $R_c = 2,05$
- ) Expériences sur Bacillus Anthracis (tableau 2)...  $R_c = 3,33$
- ( Expériences sur Eberthella Typhi (tableau 3)...  $R_c = 2,22$

Ces chiffres, d'après les calculs de E. FISCHER, indiquent que les différences obtenues sont statistiquement significatives.

Il semble donc permis d'émettre l'hypothèse que le glycogène intra-leucocytaire fournit à la cellule au moins en partie l'énergie qui lui est nécessaire pour le travail de la phagocytose.

Si cette hypothèse est exacte, plus la phagocytose sera intense, plus la consommation de glycogène sera élevée; c'est pour préciser ce point que nous avons entrepris les expériences décrites dans la deuxième partie de ce chapitre.

## 2°) Discussion des résultats rapportés dans la deuxième partie du Chapitre III.

A. ~ Une phagocytose élevée entraîne-t-elle une consommation de glycogène élevée ? Nous avons tenté de répondre à cette question par trois groupes d'expériences différentes.

- a) Etude des phagocytoses ) ( supérieur à 75 % ) suspensions de  
dont le pourcentage est : ) ( Staphylococcus  
( inférieur à 75 % ) albus à concentra-  
( tion constante.
- b) Phagocytose de Staphylococcus albus en utilisant des concentrations différentes de germes.
- c) Phagocytose de Eberthella Typhi, sans immunosérum et en présence d'immunosérum.

Si l'on examine les pourcentages moyens de consommation du glycogène, on voit que, pour les phagocytoses supérieures à 75 %, ce pourcentage s'élève à 24 %, alors qu'il est seulement de 12,3 % pour les phagocytoses inférieures à 75 %. On peut donc dire avec raison que la phagocytose la plus élevée a entraîné la consommation de glycogène la plus forte.

Dans les expériences effectuées avec Staphylococcus albus, on constate également une différence nette, pour les chiffres les plus bas (cobaye 1 : phagocytoses de 6 % et de 24 %) comme pour les chiffres les plus élevés (cobaye 4 : phagocytoses de 76 % et 100 %). On voit donc que les deux groupes d'expériences sur Staphylococcus albus donnent des résultats tout à fait concordants.

Les résultats de nos expériences sur Eberthella Typhi semblent plus nets encore ; dans ce cas particulièrement intéressant, les leucocytes provenant d'un même animal, mis en présence du même bacille, la concentration de la suspension bactérienne étant constante, ont réagi de façon différente (grâce à l'artifice utilisé : présence ou absence d'immunosérum); dans les expériences sans immunosérum, il y a eu faible phagocytose (moyenne = 28 %) et faible consommation de glycogène (moyennes = 7 %); par contre en

présence d'immunsérum, la phagocytose a été élevée (moyenne = 33 %) ainsi que la consommation de glycogène (moyenne = 23,7 %).

B. - Les faits observés :

- 1°) toute phagocytose entraîne une consommation de glycogène
- 2°) Une phagocytose forte s'accompagne d'une consommation de glycogène élevée,

montrent une relation nette entre la phagocytose et la glycogénolyse. Cependant on ne constate pas une proportionnalité rigoureuse entre les deux phénomènes, ceci semble dû à plusieurs motifs :

- 1° - D'autres facteurs que la glycogénolyse interviennent lors de la phagocytose :
  - différences dans le contact entre bactéries et leucocytes,
  - travail nécessaire pour l'englobement,
  - début de digestion intra-cellulaire des bactéries,
  - etc.
- 2° - Nos essais comportent une marge d'imprécision inévitable, due à la fois au dosage et à l'appréciation de la phagocytose. Le titrage du glycogène, malgré tous les soins que nous y avons apportés, peut-être incriminé en raison des nombreuses manipulations qu'il comporte, et surtout en raison du fait que la quantité de glycogène dosée est rapportée au nombre de leucocytes présents dans le prélèvement, nombre qui ne peut être évalué que par une numération dont la précision n'excède pas 5% à 10%.

Quant à l'appréciation de la phagocytose, la détermination du pourcentage de cellules ayant phagocyté est moins précise que la détermination de l'index. On s'en rend compte par les exemples d'index phagocytaires que nous donnons ci-dessous : (voir tableau 8).

L'examen de ce tableau montre que des phagocytoses analogues en pourcentage, peuvent correspondre à des index très différents, et un leucocyte polynucléaire ayant phagocyté cinq bactéries dépense probablement moins d'énergie qu'un autre en ayant phagocyté dix; d'autre part les leucocytes d'un même animal phagocytent avec une intensité très différente; dans ces conditions, il n'est pas possible d'observer une relation quantitative absolue entre la phagocytose et la glycogénolyse, mais les faits observés sont cependant assez nets pour que le rapport saisi entre les deux phénomènes puisse être affirmé.

TABLEAU n° 8

Evaluation de la phagocytose en pourcentage et par l'index phagocytaire.

|                        | Pourcentage<br>de Phagocytose | Index phagocytaire |
|------------------------|-------------------------------|--------------------|
|                        | -----                         | -----              |
| - Bacillus Anthracis   | ( 80 %                        | ( 7,6              |
|                        | )                             | )                  |
|                        | ( 70 %                        | ( 3,2              |
|                        | )                             | )                  |
| - Eberthella Typhi     | ( 12 %                        | ( 1,22             |
|                        | )                             | )                  |
|                        | ( 80 %                        | ( 14,0             |
|                        | )                             | )                  |
|                        | ( 29 %                        | ( 1,84             |
|                        | )                             | )                  |
|                        | ( 87 %                        | ( 13,6             |
|                        | )                             | )                  |
| - Staphylococcus albus | ( 96 %                        | ( 10,46            |
|                        | )                             | )                  |

#### CONCLUSIONS

Les résultats de nos essais nous amènent aux conclusions suivantes:

- 1° - La phagocytose s'accompagne d'une diminution du glycogène intra-leucocytaire.
- 2° - Cette consommation de glycogène est indépendante de la nature de la bactérie et du mode de phagocytose.
- 3° - On n'observe pas un rigoureux parallélisme entre la consommation du glycogène et la phagocytose, celle-ci étant difficile à évaluer avec précision en raison du nombre élevé de germes phagocytés par cellule, mais on peut dire que, en général, la consommation moyenne de glycogène est d'autant plus grande que la phagocytose est plus élevée.

## CHAPITRE IV

### PHAGOCYTOSE et TENEUR EN GLYCOGENE DES POLYNUCLEAIRES.

Dans ce chapitre, nous nous proposons d'étudier les rapports existant entre la teneur des leucocytes en glycogène et l'importance de la phagocytose. Nous venons de voir que la phagocytose s'accompagne d'une glycogénolyse active; on peut donc penser que celle-ci est un signe d'une augmentation de l'activité cellulaire; c'est pourquoi on peut se demander si la richesse des leucocytes en glycogène peut influencer sur leur capacité de phagocyter. A première vue, le fait déjà observé (2) que les leucocytes d'origine inflammatoire sont plus riches en glycogène que les leucocytes sanguins semble plaider en faveur de cette hypothèse.

Pour essayer de répondre à cette question, nous avons comparé le pouvoir phagocytaire de leucocytes à forte teneur en glycogène avec celui de leucocytes moins riches.

#### Leucocytes à forte teneur en glycogène :

Lors d'essais préliminaires, nous avons observé que les leucocytes de certains de nos animaux, particulièrement en hiver, étaient spécialement riches en glycogène. Les animaux recevant, à cette époque de l'année, une alimentation moins riche en produits frais, nous nous sommes demandé si une modification du taux de la Vitamine C dans l'organisme n'intervenait pas dans le glycogène leucocytaire. On peut d'autant plus le penser que les leucocytes, comme l'ont montré les travaux de LUDANY et DEMEGAY (55, 56), contiennent normalement une assez grande quantité d'acide ascorbique. Ainsi, nous avons donc été amenés à doser le glycogène leucocytaire au cours de la phagocytose chez des animaux rendus scorbutiques par un régime carencé en Vitamine C, escomptant que ces leucocytes seraient particulièrement chargés en glycogène.

#### Leucocytes à faible teneur en glycogène :

Nous avons cherché à abaisser "in vitro" le taux du glycogène dans des leucocytes d'origine inflammatoire; ce type d'expérience permet une comparaison entre des leucocytes provenant d'un même animal, les uns appauvris en glycogène, les autres ayant conservé leur teneur glycogénique normale.

### 1ère PARTIE

#### POUVOIR PHAGOCYTAIRE DE LEUCOCYTES A FORTE TENEUR EN GLYCOGENE.

La préparation des leucocytes, la phagocytose du staphylocoque, le dosage du glycogène, ont été effectués de la même manière que dans nos essais précédents; toutes ces opérations étant conduites parallèlement pour

des leucocytes provenant d'animaux normaux et d'animaux scorbutiques. Nous donnerons simplement ci-dessous les techniques utilisées pour l'obtention des animaux carencés et pour tester leur carence.

## 1. TECHNIQUES PARTICULIERES UTILISEES.

### a) Mise en carence d'animaux scorbutiques :

Pour effectuer nos expériences, nous avons utilisé des animaux provenant d'un élevage homogène (Institut Pasteur de Garches), les uns carencés en acide ascorbique par une nourriture composée uniquement de son et d'avoine. Ces animaux, après trois semaines de régime, présentaient des signes évidents de carence : amaigrissement, perte du poil, pétéchies. Nous avons utilisé deux séries d'animaux; sur une première série (expériences effectuées en hiver), nous nous sommes contentés des symptômes scorbutiques comme test de la carence; sur une seconde série (expériences effectuées au printemps), nous avons effectué des dosages d'acide ascorbique dans le foie et les surrénales des animaux, pour nous rendre compte de l'intensité de l'état scorbutique. Pour nous mettre à l'abri de fluctuations saisonnières toujours possibles, nous avons chaque fois dosé l'acide ascorbique du foie et des surrénales chez des animaux normaux en nombre égal à celui des animaux scorbutiques utilisés. Nous avons aussi dosé parallèlement le glycogène intra leucocytaire et effectué des mesures de la consommation du glycogène lors de la phagocytose.

### b) Dosage de l'acide ascorbique :

Nous avons procédé au dosage de l'acide ascorbique dans le foie et les surrénales de cobayes, de la façon suivante :

- Prélèvement des organes : On sacrifie le cobaye sur lequel on a produit un exsudat inflammatoire péritonéal. On incise alors largement la paroi abdominale plan cutané et plan péritonéal. On recueille l'exsudat contenu dans la cavité abdominale au moyen d'une pipette Pasteur. On isole les organes à prélever, on enlève le tissu adipeux, on pèse ensuite à la balance au 1/10 de milligramme, environ 1 gr de foie dans le cas d'un animal normal, 3 à 4 gr pour un animal scorbutique, on pèse les surrénales entières.

- Extraction de l'acide ascorbique : L'organe prélevé est broyé au mortier avec une petite quantité de sable de Fontainebleau lavé. On ajoute environ 1 cm<sup>3</sup> d'acide métaphosphorique à 2,5 %, on triture en mélangeant soigneusement, puis on ajoute de nouveau 4 cm<sup>3</sup> d'acide métaphosphorique, et on répète l'opération en triturant pendant 5 minutes, on transvase dans un tube à centrifuger en rinçant trois fois le mortier avec 1 cm<sup>3</sup> d'acide métaphosphorique (ne pas dépasser 10 cm<sup>3</sup> au total). On centrifuge pendant 5 minutes à 6000 tours/minute, on recueille le liquide dans une fiole jaugée de 25 cm<sup>3</sup> pour les organes d'animaux normaux, ou de 20 cm<sup>3</sup> dans le cas d'animaux scorbutiques. On reprend le culot à deux reprises par 4 cm<sup>3</sup> d'acide métaphosphorique, en divisant bien, et en triturant pendant 5 minutes avec un agitateur; on centrifuge à nouveau 5 minutes à 6000/tours/minute, on réunit les liquides et l'on complète le volume en lavant la fiole avec la solution d'acide méta-

phosphorique. Le liquide obtenu doit être limpide, il est faiblement coloré en jaune dans le cas d'un extractum de foie et pratiquement incolore dans le cas de l'extractum provenant des surrénales. Pour réaliser l'extraction de la meilleure façon, il est nécessaire de peser et de broyer les organes aussi rapidement que possible après le prélèvement, pour les mettre en contact avec l'acide métaphosphorique, ce qui empêche l'oxydation spontanée de l'acide ascorbique.

- Dosage colorimétrique : On utilise la méthode de TILLMANS, modifiée par MEUNIER; nous avons employé le diffusio-absorptiomètre de DOGNON comme photomètre. La sensibilité optima de l'appareil a été obtenue en employant l'écran vert, grille n° 2 à 40. L'étalonnage est fait en utilisant une grande cuve (3 cm / 1 cm / 4 cm), et des solutions d'acide ascorbique dans l'acide métaphosphorique à 2,5 % d'une concentration de 1  $\mu$  gr, 2  $\mu$  gr, 3  $\mu$  gr, 5  $\mu$  gr, 10  $\mu$  gr, par cm<sup>3</sup>. Pour chacune de ces solutions, on prélève exactement 3 cm<sup>3</sup> à la pipette jaugée, on ajoute 3 cm<sup>3</sup> de solution de bleu de dichlorophénol indophénol (voir la formule à la fin de ce chapitre), on agite par retournement, on place la cuve contenant les solutions dans le colorimètre, et l'on fait la lecture après 15 minutes. Après le mélange de la solution d'acide ascorbique avec la solution d'acide métaphosphorique, la coloration passe immédiatement du bleu au mauve violacé, et après 15 secondes reste stable. Les valeurs des déviations lues sur le cadran du galvanomètre, en utilisant successivement les solutions 1, 2, 3, 5, 10  $\mu$  gr d'acide ascorbique, permettent de calculer :  $a$  = nombre de  $\mu$  gr d'acide ascorbique par cm<sup>3</sup> correspondant à 1 division du galvanomètre. L'absorption de base calculée seulement pour les solutions colorées (extractions de foie) est obtenue de la façon suivante : à 3 cm<sup>3</sup> de solution à titrer, on ajoute 3 cm<sup>3</sup> de solution d'acide métaphosphorique à 2,5 %, on verse le tout dans une cuve que l'on place dans l'appareil, et on lit la déviation du galvanomètre, soit  $n$ . Sur la solution à doser, on opère en ajoutant 3 cm<sup>3</sup> de solution de bleu d'indophénol à 3 cm<sup>3</sup> de solution dans la grande cuve du colorimètre, on agite par retournement, et l'on fait des lectures sur le cadran du galvanomètre toutes les 15 secondes pendant 90 secondes; si la réduction est totale en 15 secondes, le galvanomètre reste stable : on est en présence d'acide ascorbique, si la réduction se poursuit, on construit la courbe des déviations en fonction du temps.

#### Calculs :

1) Absence de substances réductrices étrangères; la déviation du galvanomètre est stable =  $D$ , on peut, soit calculer suivant la formule :

$(D - n) a$  = nombre de  $\mu$  gr par cm<sup>3</sup> d'acide ascorbique,

soit calculer  $(D - n)$  et chercher la valeur trouvée sur la courbe d'étalonnage ce qui donne directement le nombre  $\mu$  gr contenus par cm<sup>3</sup>.

2) En présence de substances réductrices étrangères :

- si la courbe obtenue présente un point d'inflexion à la 15<sup>ème</sup> seconde, qui marque la fin de l'oxydation de l'acide ascorbique. On prolonge la courbe d'oxydation trouvée pour les valeurs obtenues après la 15<sup>ème</sup> seconde, ce qui

permet de déterminer le point M à l'endroit où cette courbe extrapolée coupe l'axe des ordonnées. Le point origine des déviations sera dans ce cas :  $X = N - n$ , N étant l'origine des déviations dans le cas où la solution n'a pas d'absorption de base. La déviation due à l'acide ascorbique seul sera :  $X - M$  soit par  $\text{cm}^3$   $(X - M)a$  en  $\mu\text{gr}$ .

- si la courbe ne présente pas de point d'inflexion, à la 15ème seconde, on considère qu'il n'y a pas d'acide ascorbique dosable.

Dans le cas n° 1, comme dans le cas n° 2, on multiplie le nombre de  $\mu\text{gr}$  trouvé par  $\text{cm}^3$  par le volume total de l'extraction à l'acide métaphosphorique (20 à 25  $\text{cm}^3$ ), on obtient ainsi la quantité contenue dans la prise d'essai, on rapporte à 100 grammes, et l'on exprime en milligrammes.

Exemple numérique : Pour le cobaye numéroté 15 N dans nos essais, nous avons trouvé :

- nombre de  $\mu\text{gr}$  d'acide ascorbique par  $\text{cm}^3$  correspondant à 1 division du galvanomètre, soit  $a = 0,4 \mu\text{gr}$ .
- absorption de base (déviations du galvanomètre) = 18 graduations =  $n$ .
- déviation du galvanomètre considérée comme origine lors de l'étalonnage :  $N = 77$  graduations.
- origine des graduations pour ce dosage :  $X = (N - n) = 77 - 18$ , soit 59.
- point d'inflexion de la courbe M (obtenu par prolongation de cette courbe) = 41,2.
- nombre de graduations à considérer réellement :  $(X - M) = 59 - 41,2 = 17,8$ .
- nombre de  $\mu\text{gr}$  par  $\text{cm}^3$  de la prise d'essai :  $(X - M) a = (17,8)(0,4) = 7,12 \text{ gr}/\text{cm}^3$ .
- pour la prise d'essai :  $(25 \text{ cm}^3) 7,12 \times 25 = 178 \mu\text{gr}$ .

Soit en milligrammes pour 100 gr

$$\frac{(178)(100)}{1,654} = \underline{\underline{10,8 \text{ milligrammes}/100 \text{ cm}^3}}$$

(1,654 étant le poids de la prise d'essai de foie).

#### Réactifs utilisés :

- Solution mère de bleu d'indophénol : Faire une solution saturée de dichlorophénol indophénol dans l'eau distillée à 70 degrés. Après refroidissement diluer à 1 pour 200.  
Cette solution se conserve deux semaines.

- Solution standard de bleu d'indophénol :

|                    |                                                          |       |               |
|--------------------|----------------------------------------------------------|-------|---------------|
| a) Solution tampon | ( $\text{CH}_3 \text{ CO O Na}$ , 6 $\text{O H}_2$ ..... | 11,32 | gr            |
|                    | ) $\text{CH}_3 \text{ CO O H}$ , 0,5 N .....             | 0,65  | $\text{cm}^3$ |
|                    | ( Toluène .....                                          | 11    | gouttes       |
|                    | ) Eau distillée qs. pour .....                           | 250   | $\text{cm}^3$ |

b) Solution Standard : Mélanger un volume de solution tampon d'acétate avec un volume de solution mère de bleu d'indophénol. Cette solution, de mauvaise conservation, doit être préparée extemporanément.

- Solution standard d'acide ascorbique :

|                                           |                     |
|-------------------------------------------|---------------------|
| ( Acide ascorbique crist. ....            | 50 milligrammes     |
| ) Solution d'acide métaphosphorique à 5 % | 50 cm <sup>3</sup>  |
| ( Eau distillée qs. pour .....            | 100 cm <sup>3</sup> |

Cette solution, stock, contient 0,5 milligrammes d'acide ascorbique par cm<sup>3</sup>.

Elle sert à préparer la solution standard :

|                                           |                     |
|-------------------------------------------|---------------------|
| ( solution stock .....                    | 1 cm <sup>3</sup>   |
| ) solution d'acide métaphosphorique à 5 % | 50 cm <sup>3</sup>  |
| ( eau distillée ..... qs. pour            | 100 cm <sup>3</sup> |

- Solution d'acide métaphosphorique à 5 %. Conserver à la glacière.

## 2. RESULTATS DES DOSAGES.

### a) Première série d'animaux :

Les dosages effectués comportent pour les leucocytes de cobayes scorbutiques, comme pour les leucocytes de cobayes normaux :

un dosage du glycogène avant phagocytose,  
un dosage du glycogène après phagocytose.

Le tableau suivant expose les résultats obtenus :

TABLEAU n° 9

| COBAYES NORMAUX      |               |                              |                          | COBAYES SCORBUTIQUES |               |                              |                          |
|----------------------|---------------|------------------------------|--------------------------|----------------------|---------------|------------------------------|--------------------------|
| avant<br>Phagocytose | après         | % de<br>glycogène<br>utilisé | Phago-<br>cytose<br>en % | avant<br>Phagocytose | après         | % de<br>glycogène<br>utilisé | Phago-<br>cytose<br>en % |
| 13,5 $\mu$ gr        | 12,3 $\mu$ gr | 8,9 %                        | 71 %                     | 10,4 $\mu$ gr        | 9,7 $\mu$ gr  | 6,7 %                        | 88 à%                    |
| 14 $\mu$ gr          | 10 $\mu$ gr   | 28,5                         | 73                       | 16,6 $\mu$ gr        | 12,5 $\mu$ gr | 24,7                         | 85                       |
| 14,5 $\mu$ gr        | 13,8 $\mu$ gr | 11,7                         | 91                       | 24,9 $\mu$ gr        | 26,5 $\mu$ gr | 1,6                          | 60                       |
| 18,5 $\mu$ gr        | 15,6 $\mu$ gr | 16,8                         | 78                       | 28 $\mu$ gr          | 20 $\mu$ gr   | 31,4                         | 89                       |
| 19,4 $\mu$ gr        | 16,3 $\mu$ gr | 16                           | 71                       | 20,5 $\mu$ gr        | 24,9 $\mu$ gr | 15,6                         | 85                       |
| 21,5 $\mu$ gr        | 20 $\mu$ gr   | 7                            | 81                       | 31,9 $\mu$ gr        | 29,8 $\mu$ gr | 6,6                          | 75                       |
| 28 $\mu$ gr          | 25,4 $\mu$ gr | 9,4                          | 62                       | 35 $\mu$ gr          | 30 $\mu$ gr   | 14,3                         | 86                       |
| 29,8 $\mu$ gr        | 29,5 $\mu$ gr | 1,1                          | 68                       | 40 $\mu$ gr          | 36,8 $\mu$ gr | 8                            | 71                       |
| 32,4 $\mu$ gr        | 10,9 $\mu$ gr | 66,5                         | 98                       | 43,7 $\mu$ gr        | 40 $\mu$ gr   | 8,5                          | 93                       |
| 32,5 $\mu$ gr        | 27,4 $\mu$ gr | 34                           | 58                       | 54,5 $\mu$ gr        | 47,5 $\mu$ gr | 12,8                         | 75                       |
|                      |               |                              |                          | 67 $\mu$ gr          | 54 $\mu$ gr   | 19,5                         | 79                       |
| 22,4 $\mu$ gr        | 17,5 $\mu$ gr | 21,8 %                       | 75 %                     | 34,6 $\mu$ gr        | 29 $\mu$ gr   | 16,2 %                       | 80 %                     |

N.B. - Ces résultats ne comportent pas de dosages parallèles de la Vitamine C chez les animaux mis en expérience; toutefois on peut penser que, les conditions de mise en carence étant identiques, et les incidences saisonnières étant d'autant plus favorables que ces expériences ont été effectuées en hiver, la carence en vitamine C des animaux était bien effectuée.

Les cobayes normaux pour une moyenne de 24  $\mu$  gr de glycogène, ont présenté une phagocytose de 75 %, les cobayes scorbutiques, pour une moyenne plus élevée : 34,6  $\mu$  gr présentent une phagocytose de 81 %. Du point de vue du pourcentage de consommation, on constate que pour les

- ( cobayes normaux, il y a eu 21,8 % du glycogène initial consommé,
- ) cobayes scorbutiques, il y a eu 16,2 % du glycogène initial consommé.

TABEAU n° 10

Influence de l'état physiologique des animaux sur la teneur en glycogène  
et sur l'activité phagocytaire de leurs polynucléaires.

| COBAYES NORMAUX                     |                        |            |              |                                     |  | COBAYES SCORBUTIQUES                |                        |              |        |                                     |  |
|-------------------------------------|------------------------|------------|--------------|-------------------------------------|--|-------------------------------------|------------------------|--------------|--------|-------------------------------------|--|
| Acide<br>ascorbique<br>en mg/100 Gr | Glycogène<br>p/million |            | %            | Phago-<br>cytose<br>Impor-<br>tance |  | Acide<br>ascorbique<br>en mg/100 Gr | Glycogène<br>p/million |              | %      | Phago-<br>cytose<br>Impor-<br>tance |  |
|                                     | Foie                   | Surrénales |              |                                     |  |                                     | avant                  | après        |        |                                     |  |
| -                                   | -                      | -          | 19.0         | 97 %                                |  | -                                   | 20.0                   | 16.2         | 19.0   | 97 %                                |  |
| 19.0                                | 19.0                   | -          | 13.8         | 91                                  |  | -                                   | 14.5                   | 13.8         | 11.7   | 97                                  |  |
| 19.4                                | 19.4                   | -          | 11.5         | 76                                  |  | 2,16                                | 13.0                   | 11.5         | 11.5   | 98                                  |  |
| 22.6                                | 22.6                   | -          | 11.0         | 78                                  |  | 1.9                                 | 14.5                   | 11.0         | 17.3   | 61                                  |  |
| 13.9                                | 13.9                   | 37.5       | 16.7         | 76                                  |  | 1.8                                 | 19.5                   | 16.7         | 14.4   | 80                                  |  |
| 23.0                                | 23.0                   | 97.0       | 11.1         | 76                                  |  | 0.0                                 | 13.5                   | 11.1         | 17.8   | 86                                  |  |
| 10.8                                | 10.8                   | 28.4       | 11.5         | 92                                  |  | 0.0                                 | 13.1                   | 11.5         | 11.2   | 92                                  |  |
| 41.8                                | 41.8                   | 71.4       | 10.8         | -                                   |  | 0.0                                 | 11.8                   | 10.8         | 11.8   | 94                                  |  |
| 11.4                                | 11.4                   | 45.5       | 10.5         | 82                                  |  | 0.0                                 | 14.7                   | 10.5         | 28.5   | -                                   |  |
|                                     |                        |            | 15.0<br>μ gr | 95 %                                |  |                                     | 15.0                   | 12.5<br>μ gr | 15.9 % | 87 %                                |  |
|                                     |                        |            | 32.3<br>μ gr |                                     |  |                                     | 32.3                   | 21.1<br>μ gr | 21.6 % |                                     |  |

b) Deuxième série d'animaux :

Il a été effectué chaque fois :

- un dosage du glycogène avant phagocytose,
- un dosage du glycogène après phagocytose,
- un dosage de la Vitamine C dans les surrénales,
- un dosage de la Vitamine C dans le foie,

ceci pour les animaux normaux et les animaux scorbutiques.

Nous avons obtenu les résultats suivants (voir tableau n° 10).

Les résultats des dosages de la Vitamine C montrent que la carence des animaux a été bien effectuée puisque le taux de Vitamine C trouvé chez les animaux scorbutiques est toujours beaucoup plus faible que chez les animaux témoins et même souvent nul.

Le taux du glycogène intra-leucocytaire trouvé est, comme dans le cas précédent, plus élevé que chez les animaux normaux : 32,3  $\mu$ gr contre 15,0  $\mu$ gr. Le pourcentage de glycogène utilisé étant cette fois plus fort dans le cas des animaux scorbutiques.

Des résultats portant sur les deux séries d'animaux, il ressort :

- que dans tous les cas, il y a eu consommation de glycogène lors de la phagocytose, ce qui confirme les résultats précédents,
- que la phagocytose a été la plus forte dans le cas où le glycogène était le plus abondant, toutefois, sans que l'élévation de la phagocytose soit très importante.

2ème PARTIE

POUVOIR PHAGOCYTAIRE DE LEUCOCYTES A FAIBLE TENEUR EN GLYCOGENE.

1. TECHNIQUES PARTICULIÈRES UTILISEES.

A) Diminution du taux du glycogène intra-leucocytaire.

Nous avons cette fois encore utilisé des leucocytes d'exsudat inflammatoire de cobaye obtenu suivant les techniques précédemment décrites : ces leucocytes sont mis en suspension dans du sérum de cobaye. On effectue une numération des leucocytes et un dosage du glycogène en répartissant la suspension leucocytaire suivant le tableau ci-après :

|                                    | Tube 1            | Tube 2            | Tube 3            | Tube 4              | Tube 5              |
|------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|---------------------|
| Suspension de leucocytes .....     | 1 cm <sup>3</sup> | 1 cm <sup>3</sup> | 1 cm <sup>3</sup> | 0,5 cm <sup>3</sup> | 4 cm <sup>3</sup>   |
| Sérum physiologique..              | 1 cm <sup>3</sup> |                   |                   | 0,5 cm <sup>3</sup> |                     |
| Suspension de Staphylocoques ..... |                   | 1 cm <sup>3</sup> | 1 cm <sup>3</sup> |                     |                     |
| Solution d'acide picrique .....    |                   |                   |                   |                     | 1,2 cm <sup>3</sup> |

Le séjour à l'étuve est de 30 minutes pour les tubes n° 1, 1 bis, 1 ter, et de 60 minutes pour les tubes n° 1 et n° 2. Le tube n° 1 sert au dosage du glycogène initialement présent dans les leucocytes, le tube n° 2 sert au dosage du glycogène après phagocytose, et le tube n° 3 à faire des frottis sur lames pour l'estimation de la phagocytose. Avec le tube n° 4 on effectue un test de vitalité des leucocytes qui sera décrit plus loin. Au tube n° 5 contenant 4 cm<sup>3</sup> de suspension leucocytaire, on ajoute 0,4 cm<sup>3</sup> d'une solution d'acide picrique à 11 mgr/cm<sup>3</sup>, soit en tout 1,6 cm<sup>3</sup> (la concentration du milieu en acide picrique est de 44  $\mu$ gr/cm<sup>3</sup>). Après le séjour de 60 minutes à l'étuve, on laisse 24 heures à la glacière à + 4°. On centrifuge ensuite la suspension à faible vitesse, et le culot leucocytaire est lavé à deux reprises avec du sérum de cobaye au demi; on remet ensuite en suspension en essayant de se rapprocher le plus possible de la concentration initiale, ce dont on s'assure par une numération. De cette manière, la comparaison de la phagocytose entre les leucocytes primitifs et les leucocytes traités par l'acide picrique sera valable, car on sait que l'intensité de la phagocytose dépend du rapport entre le nombre des leucocytes et le nombre de germes présents dans le même volume. Cette nouvelle suspension est répartie de la façon suivante :

|                                    | Tube n° 1         | Tube n° 2         | Tube n° 3         | Tube n° 4           |
|------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|
| Suspension de leucocytes .....     | 1 cm <sup>3</sup> | 1 cm <sup>3</sup> | 1 cm <sup>3</sup> | 0,5 cm <sup>3</sup> |
| Sérum physiologique ..             | 1 cm <sup>3</sup> |                   |                   | 0,5 cm <sup>3</sup> |
| Suspension de Staphylocoques ..... |                   | 1 cm <sup>3</sup> | 1 cm <sup>3</sup> |                     |

Chaque tube est utilisé comme précédemment pour le dosage du glycogène, avant et après phagocytose, ainsi que pour l'appréciation de

l'intensité de la phagocytose. Le tube n° 1 sert à tester la vitalité des leucocytes après leur séjour à l'étuve et à la glacière.

b) Test de vitalité utilisant la sensibilité chimiotactique des leucocytes.

Nous avons utilisé la technique de COMANDON (23); une goutte de suspension de leucocytes dont on veut tester la vitalité est placée sur une lame recouverte de grains d'amidon de pomme de terre, fixés par dessiccation. On recouvre la préparation avec une lamelle de verre qui est lutée pour éviter la dessiccation. On place les préparations à l'étuve à 37°, au bout de ce temps, on les examine au microscope. Si la vitalité des leucocytes est bonne, les leucocytes se sont déplacés dans le milieu et accolés aux grains d'amidon dont la surface est entourée d'une couronne de leucocytes étirés. Nous avons utilisé ce test, d'une part sur les leucocytes frais, aussitôt leur prélèvement, qui nous servaient de témoin; d'autre part sur les leucocytes demeurés à l'étuve et à la glacière, pour nous rendre compte si leur vitalité n'était pas affectée par ce traitement.

2. RESULTATS DES DOSAGES.

Dans tous les cas nous avons observé une très bonne vitalité, tant pour les leucocytes témoins que pour ceux traités par l'acide picrique. Les résultats des dosages du glycogène contenu dans les leucocytes témoins et dans ceux traités en vue de faire baisser leur teneur en glycogène, sont exposés dans le tableau n° 11. (page 57)

Les leucocytes témoins contiennent en moyenne 13,1  $\mu$  gr de glycogène par million; les leucocytes traités par l'acide picrique ne contiennent plus que 9,3  $\mu$  gr en moyenne.

Parallèlement la phagocytose est passée de 79 % à 63 %. La vitalité des leucocytes étant la même dans les deux cas, puisque leur déplacement et leur fixation sur les grains d'amidon étaient normaux, il semble donc que lorsque le taux de glycogène diminue, la phagocytose diminue également. Toutefois, comme nous l'avons observé dans les résultats précédents, on ne constate pas une proportionnalité rigoureuse entre les deux phénomènes.

3ème PARTIE

DISCUSSION DES RESULTATS RAPPORTES DANS LE CHAPITRE IV

1. RESULTATS OBTENUS AVEC DES LEUCOCYTES A TENEUR EN GLYCOGENE ELEVEE.

a) L'élévation du taux du glycogène chez les leucocytes de cobayes scorbutiques est-elle explicable ?

- A notre avis, on peut tenter de l'expliquer : en effet l'acide ascorbique

TABLEAU n° 11

| LEUCOCYTES TEMOINS                                     |                   |                            |                                      | LEUCOCYTES TRAITES PAR L'ACIDE PICRIQUE                |                  |                            |                                      |                                     |
|--------------------------------------------------------|-------------------|----------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------------|------------------|----------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| en $\mu$ gr<br>Glycogène<br>avant après<br>phagocytose |                   | %<br>glycogène<br>consommé | Import.<br>de la<br>phago-<br>cytose | en $\mu$ gr<br>Glycogène<br>avant après<br>phagocytose |                  | %<br>glycogène<br>consommé | Import.<br>de la<br>phago-<br>cytose | Baisse<br>de la<br>phago-<br>cytose |
| 15.9                                                   | 9.6               | 39.5 %                     | 90 %                                 | 9.5                                                    | 5.7              | 40 %                       | 80 %                                 | 10 %                                |
| 16.0                                                   | 13.3              | 16.9                       | 68                                   | 11.3                                                   | 10.3             | 8.9                        | 60                                   | 8                                   |
| 13.8                                                   | 12.8              | 7.3                        | 96                                   | 11.9                                                   | 10.4             | 12.6                       | 78                                   | 18                                  |
| 12.0                                                   | 11.4              | 5.0                        | 68                                   | 8.7                                                    | 6.7              | 23.0                       | 60                                   | 8                                   |
| 10.8                                                   | 7.8               | 25.5                       | 98                                   | 5.8                                                    | 3.4              | 48.0                       | 77                                   | 21                                  |
| 12.6                                                   | 7.8               | 40.0                       | 40                                   | 7.0                                                    | 6.5              | 7.2                        | 18                                   | 22                                  |
| 11.1                                                   | 8.3               | 25.0                       | 46                                   | 9.4                                                    | 7.3              | 19.2                       | 27                                   | 19                                  |
| 11.7                                                   | 10.3              | 12.0                       | 93                                   | 8.1                                                    | 7.3              | 9.9                        | 87                                   | 6                                   |
| 14.9                                                   | 14.4              | 3.4                        | 94                                   | 11.2                                                   | 10.8             | 3.6                        | 86                                   | 8                                   |
| 12.4                                                   | 11.9              | 4.6                        | 96                                   | 10.5                                                   | 10.1             | 3.8                        | 81                                   | 15                                  |
| 13.1<br>$\mu$ gr.                                      | 10.7<br>$\mu$ gr. | 17.9 %                     | 79 %                                 | 9.3<br>$\mu$ gr.                                       | 7.9<br>$\mu$ gr. | 17.6                       | 63 %                                 | 16 %                                |

intervient dans les deux phases de la contraction musculaire, à la phase anaérobie (transformation du glycogène en lactacidogène puis en acide lactique), puis à la phase aérobie (oxydation de l'acide lactique). Il semble donc logique que, si des leucocytes sont appauvris en acide ascorbique, le processus de glycogénèse continuant à fonctionner alors que la dégradation est ralentie, le taux du glycogène intra-leucocytaire doit augmenter. D'autre part, les travaux de WATZER (92) ont montré que l'acide ascorbique accélère la décomposition du desmo-glycogène, qui semble constituer les réserves glycogéniques de la cellule sous une forme de stockage qui doit être décomposée par libération de son complexe protidique pour pouvoir être utilisé par la cellule. La carence en Vitamine C, en ralentissant la formation du glycogène et en diminuant sa dégradation, sans bloquer le processus de glycogénèse, permet au taux du glycogène intra-leucocytaire de s'élever.

b) L'élévation du taux de la phagocytose est-il compatible avec la carence des leucocytes en Vitamine C ?

Dans ce cas en effet, si la décomposition du glycogène est bloquée, la consommation observée lors de la phagocytose devrait diminuer, or, il n'en est rien comme le montrent nos expériences. Cela doit être dû au fait que l'intervention de l'acide ascorbique dans la dégradation énergétique du glycogène, au cours du cycle de PASTEUR-MEYERHOFF, est secondaire, les phosphorylases ayant le rôle principal. La décomposition du glycogène pourrait donc être ralentie mais non bloquée, ce qui permettrait à la cellule de faire face à ses besoins énergétiques malgré la carence en Vitamine C. La faible augmentation de la phagocytose que nous avons observée serait donc bien due à l'augmentation du taux du glycogène, et n'est pas incompatible avec le fait que la carence en Vitamine C diminue la décomposition du desmo-glycogène. D'ailleurs les travaux de MAYER et MEYER (60) qui ont observé une phagocytose importante sur des leucocytes de cobayes scorbutiques infectés par des staphylocoques, viennent confirmer nos observations.

## 2. RESULTATS OBTENUS AVEC DES LEUCOCYTES A TENEUR GLYCOGENIQUE FAIBLE.

On peut penser que, mis hors de l'organisme, les leucocytes conservent intacts leurs processus cataboliques, alors que les phénomènes anaboliques sont plus ou moins troublés.

a) De fait les travaux de WAGNER (90) sur des leucocytes du sang de cheval, ont montré qu'un séjour de 24 heures à la glacière, en sérum physiologique, fait disparaître le glycogène leucocytaire. Nos essais sur des leucocytes de cobayes ne nous ont pas amenés aux mêmes résultats : il semble que les dosages de WAGNER, effectués sur des leucocytes en suspension dans un milieu salin isotonique, aient porté sur des leucocytes morts ou en mauvais état, ce qui explique que nos essais sur des leucocytes vivants placés en milieu sérique, nous aient donné des résultats différents. En effet lorsque nous avons dosé le glycogène intra-cytoplasmique des leucocytes placés en eau physiologique, pendant 24 heures à la glacière, nous avons bien retrouvé les résultats de WAGNER. Par contre, en opérant en milieu sérique, le taux du glycogène s'était maintenu; dans le premier cas, les leucocytes étaient morts, dans le second cas, leur vitalité était bonne. La disparition du glycogène, observée par WAGNER, est donc probablement due à une lyse effectuée par des diastases libérées dans le milieu lors de la destruction du cytoplasme des leucocytes.

b) Il fallait donc bloquer davantage les processus anaboliques ou modifier les processus cataboliques dans un sens tel que les leucocytes se maintiennent vivants aux dépens de leur réserve glucidique.

C'est pourquoi nous avons utilisé les nitrophénols, souvent employés dans ce but en respirométrie.

L'action de ces substances sur des leucocytes maintenus à l'étuve ne nous a pas donné de résultats concluants; il nous a fallu les mettre en plus 24 heures à la glacière, au contact des nitrophénols pour observer une diminution sensible du taux du glycogène; le séjour prolongé à l'étuve n'étant pas recommandable du fait que nos exsudats n'étaient pas prélevés dans des

conditions rigoureusement aseptiques. Nous avons donc opéré en maintenant d'abord 60 minutes à l'étuve, puis 24 heures à la glacière. Le nitrophénol employé a été l'acide picrique, qui nous a semblé, après expérimentation, plus actif que le 2.6. dinitrophénol. Pour bien éliminer l'acide picrique du milieu nous avons effectué des lavages permettant à la phagocytose de s'effectuer en l'absence de substances cliniques étrangères.

Nous avons effectué d'autre part des essais de phagocytose sur des leucocytes dans un milieu sérique contenant  $44 \mu\text{gr}/\text{cm}^3$  d'acide picrique, pour nous assurer que l'acide picrique n'agissait pas en tant que substance toxique bloquant la phagocytose ; nous avons pu constater que les chiffres obtenus comparés avec ceux provenant d'essais sur des leucocytes placés dans un milieu sérique normal n'accusaient pas de baisse de la phagocytose. Sur un point, nous pouvons noter une cause d'erreur supplémentaire inévitable : l'augmentation du nombre des manipulations (en particulier la double numération) mais le taux de diminution du glycogène est suffisamment élevé pour être significatif.

#### CONCLUSION

Nous nous proposons dans ce chapitre d'étudier les rapports existant entre la teneur des leucocytes en glycogène et l'intensité de la phagocytose. Nos expériences nous permettent d'arriver aux conclusions suivantes :

- 1) Lorsque le taux du glycogène intra-cytoplasmique des leucocytes est élevé, la phagocytose tend à augmenter.
- 2) Lorsque le taux du glycogène intra-cytoplasmique des leucocytes est faible, la phagocytose diminue. Mais la difficulté de l'expérimentation oblige à une certaine prudence dans l'interprétation des résultats.

Il semble donc bien que la glycogénolyse, source de l'énergie musculaire, soit donc probablement aussi l'une des sources de l'énergie dépensée par les leucocytes, au cours de la phagocytose.

## CHAPITRE V

### ESSAI d'INTERPRETATION du ROLE du GLYCOGENE

#### DANS la PHYSIOLOGIE des POLYNUCLEAIRES.

Nos essais, exposés dans les précédents chapitres, ont montré que la mise en oeuvre du pouvoir phagocytaire des polynucléaires s'accompagne d'une glycogénolyse appréciable. De l'ensemble des résultats obtenus, s'est dégagée une relation nette entre l'intensité de la phagocytose et l'importance de la glycogénolyse, puis un rapport entre l'activité phagocytaire et le taux du glycogène initialement présent dans les leucocytes. Ces deux notions, jointes à ce que l'on sait déjà du métabolisme glucidique des leucocytes, peuvent-elles conduire à une interprétation du rôle du glycogène dans les cellules ?

La première remarque qui s'impose est, à notre avis, la grande différence existant entre le métabolisme des leucocytes au repos, et celui des mêmes cellules en action.

#### I. - METABOLISME GLUCIDIQUE DES LEUCOCYTES AU REPOS.

Au cours de nos essais, nous avons constaté que des leucocytes inflammatoires de cobayes, placés dans un milieu contenant du sérum normal frais maintiennent constante leur teneur en glycogène, pendant un temps limité mais appréciable. Cette stabilité du glycogène intra-leucocytaire peut paraître étonnante si on la compare à la destruction enzymatique rapide, subie par ce polyside, dans les préparations de muscle ou de foie, in vitro. Un tel fait semble cependant explicable aisément, car les leucocytes convenablement isolés de l'organisme, et placés dans du sérum frais, se trouvent dans un milieu beaucoup plus proche des conditions physiologiques normales que les fragments d'organes maintenus hors de l'organisme.

Si le taux de glycogène ne varie pas rapidement "in vitro", faut-il conclure que le métabolisme de ces cellules est alors inhibé ?

Ce serait à notre avis contraire à tout ce que l'on sait du fonctionnement des cellules vivantes. Dans le cas particulier des leucocytes, les travaux de A. BAKKER (2) ont montré que le quotient respiratoire des cellules d'exsudat de lapin est supérieur à ce qui décèle l'existence de processus fermentatifs, s'ajoutant à la respiration.

Reprenant cette étude sur les leucocytes de sang d'oie, et sur les leucocytes d'exsudat de lapin, W. FLEISCHMANN (37) appliquant la méthode de WARBURG, a observé, en présence d'oxygène, une respiration équivalente pour ces deux types de cellules, et une glycolyse beaucoup plus importante pour les cellules inflammatoires que pour les cellules du sang. Ces résultats sont, nous semble-t-il, une preuve de l'influence de la surcharge glycogénique des leucocytes d'origine inflammatoire sur le métabolisme glucidique de ces cel-

lules : la présence d'un taux élevé de glycogène augmente la glycolyse intracellulaire, surtout en anaérobiose. Mais si cette glycolyse intervient, même dans le métabolisme des cellules au repos en aérobie, comment le taux de glycogène peut-il demeurer stable ? Selon R. WILLSTATER et M. ROHDEWALD (93) la désintégration des hexoses en acide lactique se produirait en deux temps :

- 1) formation du glycogène à partir de certains acides aminés ou polypeptides cytoplasmiques,
- 2) dégradation du glycogène et transformation d'une molécule du glucose formé en deux molécules d'acide lactique.

Si la première réaction se produit à la même vitesse que la deuxième réaction, le taux de glycogène ne varie pas dans la cellule.

On peut également supposer que la glycolyse aérobie se produit aux dépens des hexoses présents dans la cellule ou formés dans le milieu, sans que le glycogène soit dégradé; ce polyoside serait alors une substance de réserve utilisée seulement dans l'anaérobiose. A l'heure actuelle, il paraît difficile d'opter pour l'une ou l'autre de ces hypothèses, alors que nous ignorons si les leucocytes sont capables, comme le muscle, de refaire la synthèse du glycogène, à partir de l'acide lactique, et que la variation de la teneur des leucocytes en glycogène libre (lyo-glycogène) et en glycogène lié aux protéines (desmo-glycogène) sont encore inconnues. (Les quantités de glycogène dosées au cours de nos essais étaient trop faibles pour nous permettre de faire l'étude de cette répartition).

## II. - METABOLISME GLUCIDIQUE DES LEUCOCYTES EN ACTIVITE PHAGOCYTAIRE.

Le fait principal, mis en évidence par notre étude, est sans aucun doute, la glycogénolyse importante survenant au cours de la phagocytose. Une production simultanée d'acide lactique est possible, mais nous pensons plutôt que le glycogène décomposé a été transformé par un processus de glycolyse aérobie, puisque dans nos essais, les leucocytes étaient placés dans du sérum frais. Or, on sait, depuis les travaux de A. DELAUNAY et J. PAGES (68), que le sérum frais augmente les échanges respiratoires des globules blancs. Cependant la glycolyse anaérobie peut suffire à produire l'énergie nécessaire à la phagocytose : W. FLEISCHMANN (39) a montré, en effet, qu'une dose d'acide cyanhydrique suffisante pour bloquer la respiration de leucocytes d'exsudats de lapin, n'entrave pas une glycolyse même importante. Les cellules, mises ainsi en anaérobiose, présentent des mouvements amiboïdes, et phagocytent normalement. Toutefois, des recherches plus récentes de J. LEBRUN et R. ROBINEAUX (53) ont montré que le chimiotactisme des polynucléaires de cobayes, est aboli en présence d'acide cyanhydrique, bien que la phagocytose soit normale. Si les leucocytes sont capables d'exercer normalement leur pouvoir phagocytaire en anaérobiose, aux dépens de la glycolyse, et si comme nous l'avons observé, la phagocytose, produite en aérobie, entraîne une glycogénolyse importante, ces deux faits nous paraissent suffisants pour justifier l'importance du métabolisme glucidique dans l'activité des phagocytes.

### III. - MECANISME DE LA DEGRADATION DU GLYCOGENE INTRA-LEUCOCYTAIRE.

Que sait-on, par ailleurs, sur la dégradation du glycogène leucocytaire ? R. WILLSTATER et H. RHODEWALD (93) ont montré, dès 1931, que la glycogénolyse chez les leucocytes du sang de cheval aboutit à la formation d'acide lactique. Cependant, si l'on fait le bilan du glycogène disparu et de l'acide lactique formé, on constate toujours une perte; ce déficit peut indiquer deux phénomènes :

- 1) Un processus de glycolyse comportant des intermédiaires entre le glycogène et l'acide lactique.
- 2) Une dégradation constituée par des réactions de nature aérobie, différente de ce processus fermentatif.

L'étude de la glycogénolyse leucocytaire a été reprise plus récemment par R. WAGNER (87).

Cet auteur a tout d'abord précisé les conditions de la dégradation glycogénique des leucocytes du sang de cheval, puis isolé successivement différents intermédiaires du processus de dégradation. R. WAGNER a pu mettre en évidence des dérivés phosphorylés des hexoses (glucose 1 phosphate, glucose 6 phosphate, fructose 6 phosphate), des acides phosphoglycériques, de l'acide lactique. Ce dernier ne se forme qu'en anaérobiose, et en présence de cellules; les extraits leucocytaires, obtenus par dialyse des cellules ou action du toluol, sont incapables de provoquer la formation d'acide lactique. L'absorption des diastases sur alumine a permis d'identifier : une phosphorylase, une phosphohexoisomérase, une phosphoglycomutase.

Il apparaît donc que la dégradation du glycogène est une phosphoryse, analogue à celle du muscle, et non une hydrolyse, bien que les leucocytes, à l'encontre du muscle, contiennent une amylase active (91).

### CONCLUSIONS

Devant tous ces faits, comment ne serait-on pas frappé par l'analogie entre le métabolisme de la contraction musculaire et celui des leucocytes en activité ?

Dans les deux cas, nous constatons une diminution de la réserve glycogénique cellulaire et parallèlement se produisent des réactions enzymatiques semblables. Il nous paraît donc justifié de considérer le glycogène intra-leucocytaire, à la fois comme une source importante de l'énergie des polynucléaires, et comme la principale réserve glucidique dont disposent ces phagocytes.

## CONCLUSIONS GENERALES.

1) Au nombre des constituants chimiques des leucocytes polynucléaires se trouve le glycogène. Sa présence dans cette cellule, découverte il y a très longtemps, a été confirmée par tous les auteurs (75, 45, 87, 5) qui se sont occupés de la question.

2) Cependant, le taux du glycogène intra-leucocytaire n'est pas stable ; il paraît au contraire soumis à d'assez larges variations. Parmi les causes de variations déjà connues, citons l'âge des cellules : cellules jeunes comme les myéloblastes, ou plus âgées, myélocytes; WAGNER (89); le lieu de prélèvement : les leucocytes sanguins étant plus riches en glycogène que les leucocytes d'exsudat inflammatoire.

3) La teneur en glycogène des leucocytes varie-t-elle aussi en fonction de l'activité des cellules ?

On l'a prétendu, mais jusqu'à présent on ne possédait encore aucune donnée absolument nette sur ce point. La question posée est cependant d'importance pour qui s'intéresse aux leucocytes et aux mécanismes de défense de l'organisme, mais aussi pour tous ceux que préoccupe la physiologie cellulaire en général. Aussi avons-nous décidé de l'aborder.

Ce sont précisément les observations que nous avons faites, et les résultats que nous avons obtenus en ce domaine que nous résumerons ici, après l'exposé détaillé des chapitres précédents.

### 4) Matériel d'étude :

Les cellules étudiées ont été des leucocytes polynucléaires de cobayes, prélevés dans la cavité péritonéale, siège d'une réaction inflammatoire aseptique.

La méthode de dosage du glycogène intra-leucocytaire utilisée a été la technique de PFLUGER modifiée par WAGNER, puis par S. BAZIN (45) (5).

Les résultats fournis par les dosages nous ont montré que, d'animal à animal, la teneur des cellules en glycogène était passible d'assez larges variations : de 9  $\mu$ gr à 32  $\mu$ gr. A quoi tiennent ces variations ? Elles ne semblent pas tenir au sexe, ni à l'âge, ni à la race; peut-être des influences météorologiques sont-elles en jeu ? Les causes en sont plus vraisemblablement alimentaires et hormonales. Peut-on ajouter qu'elles tiennent au degré d'activité physiologique des cellules ? En tenant compte des expériences que nous allons résumer à présent, certainement oui.

5) Les polynucléaires sont doués de nombreuses propriétés physiologiques, ce sont des cellules capables de se déplacer, de phagocyter, autant d'activités qu'elles peuvent continuer à remplir, en aérobiose, comme en anaérobiose. Certainement, la plus spectaculaire de leurs propriétés est la phagocytose dont on connaît l'importance dans la lutte de l'organisme infecté pour l'élimination des germes pathogènes. Mais on peut se demander quelle est la source à laquelle la cellule puise son énergie au cours de l'acte phagocytaire qui entraîne obligatoirement une dépense énergétique.

Etant donné le résultat des études biochimiques sur la contraction musculaire, ne pourrait-on pas penser que le leucocyte trouve lui aussi son énergie dans la dégradation biochimique du glycogène qu'il contient ? Pour essayer de répondre à cette question, nous avons fait les expériences suivantes :

- Etude des variations de la teneur en glycogène des leucocytes avant et après phagocytose, germes étudiés : Staphylocoque, bactériidie charbonneuse, bacille typhique smooth; le milieu de suspension étant le sérum frais de cobaye

- et les expériences réalisées "in vitro".

Nous soulignons particulièrement que, toutes les fois que l'on a constaté une phagocytose importante, a eu lieu, de façon simultanée, une chute de la teneur des leucocytes en glycogène; et en l'absence de phagocytose, le glycogène leucocytaire est resté stable. Nos expériences faites avec le bacille typhique smooth montrent bien que c'est la phagocytose qui entraîne la chute du glycogène : les leucocytes qui sont maintenus au contact de ce germe en l'absence de sérum anti phagocytent très peu et gardent, à peine altérée, leur teneur initiale en glycogène.

Il y a donc glycogénolyse constante au cours de la phagocytose, tel est le point nouveau et, à notre avis, intéressant, que nous avons constaté. Restait maintenant à préciser la signification d'une pareille glycogénolyse.

6) Y a-t-il un rapport constant entre l'intensité de la phagocytose et la consommation de glycogène, et d'autre part, entre la richesse initiale des leucocytes en glycogène et l'intensité de la phagocytose ?

A la première question, nous répondrons par l'affirmative, en précisant néanmoins qu'il y a parfois forte phagocytose sans consommation importante de glycogène.

A la deuxième question, nous répondrons également "OUI" encore que nous ayons eu l'occasion de constater des taux de phagocytose importants avec des leucocytes qui n'étaient pas très riches en glycogène.

En résumé, si nous sommes en mesure d'affirmer, dans l'état actuel de nos expériences, qu'il y a toujours consommation de glycogène au cours de la phagocytose, l'importance de cette dernière ne paraît pas toujours régulièrement liée à la richesse initiale en glycogène des leucocytes et à l'importance de la glycogénolyse.

7) Si l'on admet que la glycogénèse musculaire n'a pas la valeur d'une dégénérescence pour la cellule musculaire, alors que plusieurs auteurs ont cependant admis cette hypothèse pour les leucocytes, après les recherches que nous venons de rapporter, nous avons peine à les suivre dans cette voie, et nous pensons plutôt avec EHRLICH, de HAAN, et WILLSTATTER, que nous nous trouvons ici devant l'indice d'une hyper activité cellulaire. A notre avis, le glycogène intra-cellulaire des polynucléaires est une source énergétique importante utilisée par ces cellules dans leur activité.

-----oOo-----

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.

1. - ABRAMSON (H.A.) J. Exp. Méd. 1927, 46, 987.
2. - BAKKER (A.), Ergb. der Physiol., 1928, 27, 1. .
3. - BAUER (H.), Ztschr. f. mikro. anat. forsh. 1933, 33, 143.
4. - BAZIN (S.), ROBINEAUX (R.), DELBARRE (J.), Sang, 1951, 22, 518.
5. - BAZIN (S.), DELAUNAY (A.), ROBINEAUX (R.) C.R. Soc. Biol., 1951, 145 1855.
6. - BAZIN (S.), DELAUNAY (A.), Ann. I.P., 1953, 84, 895.
7. - BERNARD (C.), 1848 C.R. Ac. Sc. 1848, 27, 249 253 514.
8. - BERNARD (C.), 1850 C.R. Ac. Sc. 31, 371 374.
9. - BERNARD (C.), 1851 Mem. Soc. Biol. 144 146.
10. - BERNARD (C.), 1853 Ann. Sc. Nat. Zool. 19, 282 350.
11. - BERNARD (C.), 1853 Arch. Gen. Med., 1 762.
12. - BERNARD (C.), 1877 C.R. Ac. Sc. 84 999.
13. - BERNARD (C.), 1877 Ann. Clin. et Phys. 2 397 407.
14. - BERNARD (C.), 1878 Gaz. Med. 63 64 76.
15. - BERNARD (C.), 1878 Journ. Pharm. et Clin. 4° Série 27 Mars 260 265.
16. - BERRY (L.S.), STARR (R.W.), HALLER (E.C.), Journ. of Bact. 1949, 57 603.
17. - BHATNAGAR (S.S.), Brit. Journ. Exp. Path. 1935 16 375.
18. - BOARI (D.), Giorn. Batter. e. Immunol. 1938 20 1.
19. - BOIVIN (A.), 1941, Rev. Immunol. 6, 273.
20. - BOIVIN (A.), DELAUNAY (A.), 1947, Phagocytose et infection (Herman éd.) 45, 84.
21. - BORDET (J.), Ann. I.P., 1896 10 104
22. - CLARK (Er et El), 1930 Americ. Journ. Anat. 46 111.
23. - COMMANDON (J.), 1920, Ann. I.P. 34, 1.
24. - DELAUNAY (A.), PAGES (J.) C.R. Soc. Biol. 1945, 139 557.
25. - DELAUNAY (A.), PAGES (J.), C.R. Acad. Sc. 1946, 222 933.
26. - DELAUNAY (A.), PAGES (J.), Ann. I.P. 1946, 72 458.
27. - DELAUNAY (A.), Presse Méd. 59° Année, n° 62, 1283, 1287.
28. - DELAUNAY (A.), Ann. I.P. 1944, 70 372.
29. - DELAUNAY (A.) Rev. Immunol. 1943 8 96.
30. - DESVIGNES (A.), Thèse Pharmacie 1952.
31. - DISCOMBE (G.), J. of Path. and Bact. 1946, 58 572.

32. - EHRlich (P.), Die Anemie Nathnagels Handburch 1898, 8.
33. - ERANKO (O.), Nature 1950, 165 116.
34. - FENN (W.O.), Journ. Gen. Physiol. 1921, 4 373.
35. - FERMI (E.), Journ. Gen. Physiol. 1921 3 465, 575.
36. - FERMI (E.), Journ. Gen. Physiol. 1923, 5 311.
37. - FLEISCHMANN (W.), Ergeb. D. Physiolog. 1928, 27 I.
38. - FLEISCHMANN (W.), Pfüggers Arch. D. Gen. Physiol. 1927, 215 273.
39. - FLEISCHMANN (W.), Biochem. Zeitschr. 1927, 184 385.  
- - - 1928, 200 25.
40. - GIBBS (R.P.), STOWELL (R.E.), Blood 1949 4 569.
41. - GLANZMANN (E.), Ergb. der Physiol. 1941 44 473.
42. - GOMORI (G.), Ann. J. Clin. Path. 1946 16 177
43. - GOOD (C.A.), KRAMER (H.), SOMOGYI (M.), Journ. Biol. Chem. 1933 100 485.
44. - GUGGENHEIM (K.), BUECHLER (E.), J. Hyg. 1947, 45 103.
45. - HAAN (J. de), Pfügg. Arch. 1922, 144 448.
46. - HAAN (J. de), Biochem. Zeitschr. 1921, 128 124.
47. - HABELMAN (G.), Klin. Wochenschr. n° 20 mai 1941, 517.
48. - HAGEDORN (H.C.), JENSEN (B.N.), Biochem. Zeitschr. 1923 135 46.
49. - HAIGHT (W.F.), ROSSITER (R.J.), Blood 1950, 5 267.
50. - HAMBURGER (M.J.), Physikalisch chem. untersuchungen über phagocyten  
(Wiesbaden) 1912.
51. - KLIGMAN (A.M.), BALDRIDGE (G.D.), REBEL (G.), PILLSBURG (D.M.),  
J. Lab. a Clin. Med. 1951, 10 332.
52. - LEBRUN (J.), DELAUNAY (A.). Ann. I. P. 1951 80 524.
53. - LEBRUN (J.), PAGES, ROBINEAUX (R.), C.R. Ac. Sc. 1945, 220 798.
54. - LEDINGHAM (J.C.G.), Proc. Roy. Soc. Series B 1908 80 188.
55. - LUDANY (G. de), DEMEGAY (J.), C.R. Soc. Biol. 1937, 126 321.
56. - LUDANY (G. de), ZSELYONSKA (P.). C.R. Soc Biol. 1937 125 198.
57. - MADSEN (F.), WULF (O.), Ann. I.P. 1919, 33 437.
58. - MANDEL (P.), METAIS (P.), CUNY (S.). C.R. Ao. 1950, 231 1172.
59. - MANDEL (P.), METAIS (P.), CUNY (S.). C.R. Soc. Biol. 1951, 145 1235.
60. - MAYER (E.), MEYER (M.E.), Bull. J. Hokin's Hosp. 1944 74 98.
61. - METCHNIKOFF (E.). Ann. I.P. 1887, I 197.
62. - METCHNIKOFF (E.), Ann. I.P. 1888, II 610.
63. - METCHNIKOFF (E.), Ann. I.P. 1889, 3 289.
64. - METCHNIKOFF (E.), Ann. I.P. 1890, 4 65, 87.

65. - METCHNIKOFF (E.), Ann. I.P. 1891, 2 465.
66. - METCHNIKOFF (E.), Ann. I.P. 1895, 2 433.
67. - MUDD (S.), CUTCHEON (M.), LUCKE (C.), Physiol. Rev. 1934, 14 210.
68. - PAGES (J.), DELAUNAY (A.), C.R. Ac. Sc. 1945 220 798.
69. - PONDER (E.), Protoplasma 1927, 3 611.
70. - PONDER (E.), Protoplasma 1929, 6 522.
71. - RABINOVITCH (M.), ANDRENCI (D.), Blood 1949 5 580.
72. - ROBINEAUX (R.) BAZIN (S.), DELAUNAY (A.), C.R. 3<sup>e</sup> Congrès Soc. Intern. Europ. Hémat. Rome 1951 123.
73. - ROBINEAUX (R.), FREDERICQ (J.), Film sur phagocytose lab. du Professeur CHEVREMONT, Liège, Prix du Cinéma Méd. Chir. 1953.
74. - ROSSITER (R.J.), WONG (E.), J. Biol. Chem. 1949, 180 933.
75. - SALMON (P.), Thèse Fac. Méd. Paris, 1899.
76. - SAKO (W.S.), J. Pediatr. 1942, 20 475.
77. - SHAFFER (P.A.), SOMOGYI (M.), J. Biol. Chem. 1932, 100 695.
78. - SMITH (C.), Proceed. Soc. Exp. Biol. a Méd. 1949, 72 209.
79. - SOMOGYI (M.), J. Biol. Chem. 1926, 70 599.
80. - SOMOGYI (M.), J. Biol. Chem. 1933, 100 695.
81. - SOMOGYI (M.), J. Biol. Chem. 1937, 117 77.
82. - STEFFRE (C.H.), J. of Infect. Dis. 1950, 86 12.
83. - THORELL (B.O.), Acta Medica Scandinavia, 1947 Supplément 200.
84. - Van der BERGUE (L.), HOFFMANN (J.), CR Soc. Biol. 1945, 139 234.
85. - WACHSTEIN (M.), Blood, 1949 4 54.
86. - WACHSTEIN (M.), J. Lab. and Clin. Med. 1946 31 1.
87. - WAGNER (R.), Arch. of Biochem. 1946 2 249.
88. - WAGNER (R.), Arch. of Biochem. 1950 29 260.
89. - WAGNER (R.), Arch. of Biochem. 1950 26 123.
90. - WAGNER (R.), Blood 1947 2 235.
91. - WAGNER (R.) et YOURKE (A.), Arch. of Biochem. 1952, 30 174.
92. - WATZER (J.), Bull. Soc. Chim. Biol. 1939 21 1242.
93. - WILLSTATER (R.), Hoppe Seyler's Zeitschr. 1931, 203 71, 189.
94. - WILLSTATER (R.), RHODEWALD (M.), Hoppe Seyler's Zeitschr. 1937 247 115, 127.
95. - WILLSTATER (R.), RHODEWALD (M.), Hoppe Seyler's Zeitschr. 1930 188 7 107.
96. - WONG (E.), Nature 1951, 168 81.

TABLE DES MATIERES

|                                                                                                                                               | Pages |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| INTRODUCTION .....                                                                                                                            | 7     |
| <u>CHAPITRE I.</u> - Rappel de la constitution chimique et des<br>caractères physiologiques principaux des<br>leucocytes polynucléaires ..... | 11    |
| <u>Première partie</u> : Constitution chimique et métabolisme des<br>polynucléaires .....                                                     | 11    |
| <u>Deuxième partie</u> : Caractères physiologiques .....                                                                                      | 16    |
| <u>CHAPITRE II.</u> - Essais personnels, techniques utilisées .....                                                                           | 25    |
| <u>Première partie</u> : Obtention des suspensions de leucocytes<br>polynucléaires à partir du cobaye .....                                   | 25    |
| <u>Deuxième partie</u> : Technique de phagocytose "in vitro"<br>employée .....                                                                | 27    |
| <u>Troisième partie</u> : Dosage du glycogène .....                                                                                           | 28    |
| <u>CHAPITRE III.</u> La glycogénolyse au cours de la phagocytose ....                                                                         | 34    |
| <u>Première partie</u> : Phagocytose et variation intra-leucocy-<br>taire de la teneur en glycogène .....                                     | 34    |
| <u>Deuxième partie</u> : La baisse du taux du glycogène est-elle<br>proportionnelle à la phagocytose ? .....                                  | 38    |
| <u>Troisième partie</u> : Discussion des résultats rapportés dans<br>le chapitre III .....                                                    | 43    |
| <u>CHAPITRE IV</u> - Phagocytose et teneur en glycogène des poly-<br>nucléaires .....                                                         | 47    |
| <u>Première partie</u> : Pouvoir phagocytaire de leucocytes à<br>forte teneur en glycogène .....                                              | 47    |
| <u>Deuxième partie</u> : Pouvoir phagocytaire de leucocytes à<br>faible teneur en glycogène .....                                             | 54    |
| <u>Troisième partie</u> : Discussion des résultats rapportés dans<br>le chapitre IV.....                                                      | 56    |
| <u>CHAPITRE V.</u> - Essai d'interprétation du rôle du glycogène dans<br>la physiologie des polynucléaires .....                              | 60    |
| <u>Première partie</u> : Métabolisme glucidique des leucocytes au<br>repos .....                                                              | 60    |
| <u>Deuxième partie</u> : Métabolisme glucidique des leucocytes en<br>activité phagocytaire .....                                              | 61    |

|                                                                                               | Pages |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| <u>Troisième partie</u> : Mécanisme de la dégradation du<br>glycogène intra-leucocytaire .... | 62    |
| <u>CONCLUSION GENERALE</u> .....                                                              | 63    |
| Index bibliographiques .....                                                                  | 66    |

VU et permis d'imprimer,  
Le Recteur de l'Académie de Paris, .

VU,  
Le Doyen de la Faculté de Pharmacie



